

09/856-333
Translation
16cl

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

(PCT Article 36 and Rule 70)

RECEIVED
NOV 19 2001
TECH CENTER 1600/2900

Applicant's or agent's file reference E01/1084/WO	FOR FURTHER ACTION See Notification of Transmittal of International Preliminary Examination Report (Form PCT/IPEA/416)	
International application No. PCT/DE99/03747	International filing date (day/month/year) 19 November 1999 (19.11.99)	Priority date (day/month/year) 19 November 1998 (19.11.98)
International Patent Classification (IPC) or national classification and IPC C12Q 1/68		
Applicant EPIGENOMICS AG		

1. This international preliminary examination report has been prepared by this International Preliminary Examining Authority and is transmitted to the applicant according to Article 36.
2. This REPORT consists of a total of <u>9</u> sheets, including this cover sheet. <input type="checkbox"/> This report is also accompanied by ANNEXES, i.e., sheets of the description, claims and/or drawings which have been amended and are the basis for this report and/or sheets containing rectifications made before this Authority (see Rule 70.16 and Section 607 of the Administrative Instructions under the PCT). These annexes consist of a total of _____ sheets.
3. This report contains indications relating to the following items: I <input checked="" type="checkbox"/> Basis of the report II <input type="checkbox"/> Priority III <input checked="" type="checkbox"/> Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability IV <input type="checkbox"/> Lack of unity of invention V <input checked="" type="checkbox"/> Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement VI <input checked="" type="checkbox"/> Certain documents cited VII <input type="checkbox"/> Certain defects in the international application VIII <input checked="" type="checkbox"/> Certain observations on the international application

Date of submission of the demand 19 June 2000 (19.06.00)	Date of completion of this report 05 December 2000 (05.12.2000)
Name and mailing address of the IPEA/EP	Authorized officer
Facsimile No.	Telephone No.

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/DE99/03747

I. Basis of the report

1. With regard to the **elements** of the international application:*

- ☐ the international application as originally filed
- ☒ the description:
pages _____ 1-21 _____, as originally filed
pages _____, filed with the demand
pages _____, filed with the letter of _____
- ☒ the claims:
pages _____ 1-29 _____, as originally filed
pages _____, as amended (together with any statement under Article 19
pages _____, filed with the demand
pages _____, filed with the letter of _____
- ☐ the drawings:
pages _____, as originally filed
pages _____, filed with the demand
pages _____, filed with the letter of _____
- ☐ the sequence listing part of the description:
pages _____, as originally filed
pages _____, filed with the demand
pages _____, filed with the letter of _____

2. With regard to the **language**, all the elements marked above were available or furnished to this Authority in the language in which the international application was filed, unless otherwise indicated under this item.

These elements were available or furnished to this Authority in the following language _____ which is:

- ☐ the language of a translation furnished for the purposes of international search (under Rule 23.1(b)).
- ☐ the language of publication of the international application (under Rule 48.3(b)).
- ☐ the language of the translation furnished for the purposes of international preliminary examination (under Rule 55.2 and/or 55.3).

3. With regard to any **nucleotide and/or amino acid sequence** disclosed in the international application, the international preliminary examination was carried out on the basis of the sequence listing:

- ☐ contained in the international application in written form.
- ☐ filed together with the international application in computer readable form.
- ☐ furnished subsequently to this Authority in written form.
- ☐ furnished subsequently to this Authority in computer readable form.
- ☐ The statement that the subsequently furnished written sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed has been furnished.
- ☐ The statement that the information recorded in computer readable form is identical to the written sequence listing has been furnished.

4. ☐ The amendments have resulted in the cancellation of:

- ☐ the description, pages _____
- ☐ the claims, Nos. _____
- ☐ the drawings, sheets/fig _____

5. ☐ This report has been established as if (some of) the amendments had not been made, since they have been considered to go beyond the disclosure as filed, as indicated in the Supplemental Box (Rule 70.2(c)).**

* Replacement sheets which have been furnished to the receiving Office in response to an invitation under Article 14 are referred to in this report as "originally filed" and are not annexed to this report since they do not contain amendments (Rule 70.16 and 70.17).

** Any replacement sheet containing such amendments must be referred to under item 1 and annexed to this report.

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/DE99/03747

III. Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability

1. The questions whether the claimed invention appears to be novel, to involve an inventive step (to be non obvious), or to be industrially applicable have not been examined in respect of:

☐ the entire international application.

☒ claims Nos. 25

because:

☐ the said international application, or the said claims Nos. _____
relate to the following subject matter which does not require an international preliminary examination (*specify*):

☒ the description, claims or drawings (*indicate particular elements below*) or said claims Nos. 25
are so unclear that no meaningful opinion could be formed (*specify*):

See Supplemental Sheet

☐ the claims, or said claims Nos. _____ are so inadequately supported
by the description that no meaningful opinion could be formed.

☐ no international search report has been established for said claims Nos. _____

2. A meaningful international preliminary examination cannot be carried out due to the failure of the nucleotide and/or amino acid sequence listing to comply with the standard provided for in Annex C of the Administrative Instructions:

☐ the written form has not been furnished or does not comply with the standard.

☐ the computer readable form has not been furnished or does not comply with the standard.

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/DE 99/03747

Supplemental Box

(To be used when the space in any of the preceding boxes is not sufficient)

Continuation of: III

The wording of **Claim 25** is unclear because the expression "it is an amplified DNA sample [...] in a second run of the procedure becomes itself a DNA sample" is incomprehensible. Due to this lack of clarity, the features of the corresponding process are also incomprehensible, and therefore **Claim 25** cannot be examined.

With reference to the applicant's letter of 18 October 2000, the International Preliminary Examining Authority is of the opinion that the lack of clarity in Claim 25 is not so much caused by a typographical error ("step c)" or "step e)"), but rather due to the fact that the expression "that it is a [...] sample [...] becomes itself a sample" is grammatically incomprehensible.

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.
PCT/DE 99/03747

V. Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement

1. Statement

Novelty (N)	Claims	1-24, 26-27, 29	YES
	Claims	28	NO
Inventive step (IS)	Claims	1-24, 26-27	YES
	Claims	28-29	NO
Industrial applicability (IA)	Claims	1-24, 26-29	YES
	Claims		NO

2. Citations and explanations

This report makes reference to the following documents:

- D1: WO-A-97/46705 (John Hopkins University), 11 December 1997;
D2: WO-A-93/22457 (Massachusetts Inst. Of Technology), 11 November 1993;
D3: NUCLEIC ACIDS RESEARCH (Warnecke et al.), vol. 25, no. 21, 1997, pages 4422-4426.

1. NOVELTY

- 1.1 **Claim 28** does not meet the requirements of PCT Article 33(2) for the following reasons:

A kit suitable for carrying out the process according to Claim 1 of the present application and containing DNA and control DNA as well as reagents for displaying variable methylation patterns is disclosed in document D1 (page 37, line 22 to page 38, line 13; Claims 15-19 and 22).

The International Preliminary Examining Authority does not share the view expressed in the applicant's letter of 18 October 2000 that the kit according to D1 is not suitable for carrying out the process

according to Claim 1 of the present application. Although the formation of a heteroduplex is not actually an essential feature of the process according to D1 (as opposed to the process in the present Claim 1), the components of the kit in D1 (CpG-specific primers, control DNA and reagents for modifying unmethylated cytosine) enable the process according to Claim 1 to be carried out (including the formation of a heteroduplex). Therefore the kit according to D1 is suitable for carrying out this process (PCT Examination Guidelines, Chapter III-4.8).

- 1.2 The remaining **Claims 1-24, 26-27 and 29** are novel within the meaning of PCT Article 33(2), since the prior art available does not disclose any processes or kits with all the features of these claims.

2. INVENTIVE STEP

However, **Claim 29** does not meet the requirements of PCT Article 33(3) for the following reasons:

- 2.1 In comparison with the kit from D1, the kit of the present **Claim 29** differs only in that it includes totally methylated and/or demethylated DNA. However, the inclusion of such control DNA in a kit would be straightforward for a person skilled in the art (see e.g. D3, page 4122, right-hand column). Consequently, the subject matter of Claim 29 does not appear to involve an inventive step.
- 2.2 In contrast, **Claims 1-24 and 26-27** appear to be inventive within the meaning of PCT Article 33(3) for the following reasons:

D1, which can be considered the closest prior art, discloses a process for identifying 5-methylcytosine positions with all the features of steps a) to c) of the present **Claim 1** (Claims 1-4). The subject matter of Claim 1 differs from this in that heteroduplexes are formed from the amplification of steps b) and c), and the non-complementary base pairs of said heteroduplexes are specifically marked (steps d) and e)). This difference permits a rapid identification of methylated cytosines without sequencing the amplified DNA molecules.

On the basis of D1, the problem that Claim 1 seeks to solve can be seen as that of providing an alternative simplified process for identifying methylated cytosines in genomic DNA.

The International Preliminary Examining Authority agrees with the applicant's argument (letter of 18 October 2000) that the available prior art (including document D2) gives no indication of the formation of heteroduplexes based on asymmetrical methylation. It would therefore not be straightforward for a person skilled in the art to include the formation and detection of a heteroduplex in the analytical process for methylated cytosine in D1, and thus combine all the features set out in Claim 1. Consequently, the subject matter of **Claim 1** appears to involve an inventive step within the meaning of PCT Article 33(3).

2.3 **Claims 2-24 and 26-27** are dependent on Claim 1 and therefore also meet the PCT requirements for novelty

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/DE 99/03747

and inventive step.

3. INDUSTRIAL APPLICABILITY

The subject matter of **Claims 1-24 and 26-29** appears to be industrially applicable, and therefore meets the requirements of PCT Article 33(4).

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/DE99/03747

VI. Certain documents cited

1. Certain published documents (Rule 70.10)

<u>Application No. Patent No.</u>	<u>Publication date (day/month/year)</u>	<u>Filing date (day/month/year)</u>	<u>Priority date (valid claim) (day/month/year)</u>
WO 99 28498 A	10 June 1999 (10.06.1999)	27 November 1998 (27.11.1998)	27 November 1997 (27.11.1997)

See Supplemental Box

2. Non-written disclosures (Rule 70.9)

<u>Kind of non-written disclosure</u>	<u>Date of non-written disclosure (day/month/year)</u>	<u>Date of written disclosure referring to non-written disclosure (day/month/year)</u>
---------------------------------------	--	--

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/DE 99/03747

Supplemental Box

(To be used when the space in any of the preceding boxes is not sufficient)

Continuation of: VI

The patent cited (P document) was published after the priority date but before the filing date of the present application. Since the priority claim of the present application appears to be valid, the cited P document is not relevant in the international phase. However, it may form part of relevant prior art in the regional phase of the present application.

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.
PCT/DE 99/03747

VIII. Certain observations on the international application

The following observations on the clarity of the claims, description, and drawings or on the question whether the claims are fully supported by the description, are made:

1. **Claim 1** does not meet the requirements of PCT Article 6 because the subject matter for which protection is sought is not clearly defined. Step a) of the claim attempts to define its subject matter in terms of the result to be achieved ("chemically ... treated in such a way that cytosine and 5-methylcytosine react differently"). However, this merely states the problem addressed.
2. Step b) of **Claim 1** refers to "the same nucleic acid section", although Claim 1 does not mention any such section. This results in the definition of the subject matter of Claim 1 being unclear (PCT Article 6).
3. **Claim 6** does not meet the requirements of PCT Article 6 regarding conciseness, because it does not contain any feature that goes beyond the features of Claim 1.
4. The expression "sufficiently selective" used in **Claims 9 and 10** is vague and unclear, and leaves the reader uncertain about the technical features of the backbone cleavage in question. This results in the definition of the subject matter of these claims being unclear (PCT Article 6).
5. **Claim 11** is unclear because it refers to DNA fragments according to step e) of Claim 1, but this step does not mention any DNA fragments.

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.
PCT/DE 99/03747

VIII. Certain observations on the international application

6. **Claim 15** is also unclear, because it refers to "the size of the fragments produced in step e) according to Claim 1, but step e) does not mention any such fragments.
7. **Claim 17** is unclear (PCT Article 6), because the meaning of the expression "around the maximum detectable mass range" is unclear.
8. **Claims 18-20** are unclear, because they refer to the PCR primers and PCR products according to Claims 1 and 2, but these claims do not mention any such PCT primers or products.
9. The term "less specific variant" used in **Claim 27** is vague and unclear, and leaves the reader uncertain about the technical features of the backbone cleavage in question. This results in the definition of the subject matter of this claim being unclear (PCT Article 6).
10. The same objection applies to the expression "two ... as different as possible" in **Claim 28**.
11. **Claims 28-29** are unclear and do not meet the requirements of PCT Article 6 in so far as the subject matter of the protection sought is not clearly defined. The functional information "reagents for highlighting..." and "reagents required to..." do not enable a person skilled in the art to ascertain which chemical features are required in order to carry out the functions mentioned.

TENT COOPERATION TREA

PCT

NOTIFICATION OF ELECTION

(PCT Rule 61.2)

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

Assistant Commissioner for Patents
United States Patent and Trademark
Office
Box PCT
Washington, D.C.20231
ETATS-UNIS D'AMERIQUE

in its capacity as elected Office

Date of mailing (day/month/year)

26 July 2000 (26.07.00)

International application No.

PCT/DE99/03747

Applicant's or agent's file reference

E01/1084/WO

International filing date (day/month/year)

19 November 1999 (19.11.99)

Priority date (day/month/year)

19 November 1998 (19.11.98)

Applicant

BERLIN, Kathrin

1. The designated Office is hereby notified of its election made:



in the demand filed with the International Preliminary Examining Authority on:

19 June 2000 (19.06.00)



in a notice effecting later election filed with the International Bureau on:

2. The election ☒ was

was not

made before the expiration of 19 months from the priority date or, where Rule 32 applies, within the time limit under Rule 32.2(b).

The International Bureau of WIPO
34, chemin des Colombettes
1211 Geneva 20, Switzerland

Facsimile No.: (41-22) 740.14.35

Authorized officer

R. Forax

Telephone No.: (41-22) 338.83.38

Copy for the Elected Office (EO/US)
PATENT COOPERATION TREATY

PCT/DE99/03747

PCT

NOTIFICATION OF THE RECORDING
OF A CHANGE

(PCT Rule 92bis.1 and
Administrative Instructions, Section 422)

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

SCHUBERT, Klemens
Joachimstrasse 9
D-10119 Berlin-Mitte
ALLEMAGNE

Date of mailing (day/month/year) 23 January 2001 (23.01.01)	IMPORTANT NOTIFICATION
Applicant's or agent's file reference E01/1084/WO	
International application No. PCT/DE99/03747	International filing date (day/month/year) 19 November 1999 (19.11.99)

1. The following indications appeared on record concerning:

☒ the applicant ☐ the inventor ☐ the agent ☐ the common representative

Name and Address EPIGENOMICS GMBH Kastanienallee 24 D-10435 Berlin Germany	State of Nationality DE	State of Residence DE
	Telephone No. +49304404090	
	Facsimile No. +493044040999	
	Teleprinter No.	

2. The International Bureau hereby notifies the applicant that the following change has been recorded concerning:

☒ the person ☒ the name ☐ the address ☐ the nationality ☐ the residence

Name and Address EPIGENOMICS AG Kastanienallee 24 D-10435 Berlin Germany	State of Nationality DE	State of Residence DE
	Telephone No. +49304404090	
	Facsimile No. +493044040999	
	Teleprinter No.	

3. Further observations, if necessary:

4. A copy of this notification has been sent to:

☒ the receiving Office ☐ the designated Offices concerned
☐ the International Searching Authority ☒ the elected Offices concerned
☐ the International Preliminary Examining Authority ☐ other:

The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland Facsimile No.: (41-22) 740.14.35	Authorized officer Ellen Moyse Telephone No.: (41-22) 338.83.38
---	---

VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM
GEBIET DES PATENTWESENS

PCT

REC'D 08 DEC 2000

WIPO

PCT

INTERNATIONALER VORLÄUFIGER PRÜFUNGSBERICHT

(Artikel 36 und Regel 70 PCT)



Aktenzeichen des Anmelders oder Anwalts ?	WEITERES VORGEHEN siehe Mitteilung über die Übersendung des internationalen vorläufigen Prüfungsbericht (Formblatt PCT/IPEA/416)	
Internationales Aktenzeichen PCT/DE99/03747	Internationales Anmeldedatum (Tag/Monat/Jahr) 19/11/1999	Prioritätsdatum (Tag/Monat/Tag) 19/11/1998
Internationale Patentklassifikation (IPK) oder nationale Klassifikation und IPK C12Q1/68		
Anmelder EPIGENOMICS GMBH et al.		

- Dieser internationale vorläufige Prüfungsbericht wurde von der mit der internationale vorläufigen Prüfung beauftragte Behörde erstellt und wird dem Anmelder gemäß Artikel 36 übermittelt.
- Dieser BERICHT umfaßt insgesamt 9 Blätter einschließlich dieses Deckblatts.
 - ☐ Außerdem liegen dem Bericht ANLAGEN bei; dabei handelt es sich um Blätter mit Beschreibungen, Ansprüchen und/oder Zeichnungen, die geändert wurden und diesem Bericht zugrunde liegen, und/oder Blätter mit vor dieser Behörde vorgenommenen Berichtigungen (siehe Regel 70.16 und Abschnitt 607 der Verwaltungsrichtlinien zum PCT).

Diese Anlagen umfassen insgesamt Blätter.

3. Dieser Bericht enthält Angaben zu folgenden Punkten:

- I ☒ Grundlage des Berichts
- II ☐ Priorität
- III ☒ Keine Erstellung eines Gutachtens über Neuheit, erfinderische Tätigkeit und gewerbliche Anwendbarkeit
- IV ☐ Mangelnde Einheitlichkeit der Erfindung
- V ☒ Begründete Feststellung nach Artikel 35(2) hinsichtlich der Neuheit, der erfinderische Tätigkeit und der gewerbliche Anwendbarkeit; Unterlagen und Erklärungen zur Stützung dieser Feststellung
- VI ☒ Bestimmte angeführte Unterlagen
- VII ☐ Bestimmte Mängel der internationalen Anmeldung
- VIII ☒ Bestimmte Bemerkungen zur internationalen Anmeldung

Datum der Einreichung des Antrags 19/06/2000	Datum der Fertigstellung dieses Berichts 05.12.2000
Name und Postanschrift der mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragten Behörde:  Europäisches Patentamt D-80298 München Tel. +49 89 2399 - 0 Tx: 523656 epmu d Fax: +49 89 2399 - 4465	Bevollmächtigter Bediensteter Barz, W Tel. Nr. +49 89 2399 7320 

INTERNATIONALER VORLÄUFIGER PRÜFUNGSBERICHT

Internationales Aktenzeichen PCT/DE99/03747

I. Grundlage des Berichts

1. Dieser Bericht wurde erstellt auf der Grundlage (*Ersatzblätter, die dem Anmeldeamt auf eine Aufforderung nach Artikel 14 hin vorgelegt wurden, gelten im Rahmen dieses Berichts als "ursprünglich eingereicht" und sind ihm nicht beigefügt, weil sie keine Änderungen enthalten.*):

Beschreibung, Seiten:

1-21 ursprüngliche Fassung

Patentansprüche, Nr.:

1-29 ursprüngliche Fassung

2. Hinsichtlich der **Sprache**: Alle vorstehend genannten Bestandteile standen der Behörde in der Sprache, in der die internationale Anmeldung eingereicht worden ist, zur Verfügung oder wurden in dieser eingereicht, sofern unter diesem Punkt nichts anderes angegeben ist.

Die Bestandteile standen Behörde in der Sprache: , zur Verfügung bzw. wurden in dieser Sprache eingereicht; dabei handelt es sich um

- ☐ die Sprache der Übersetzung, die für die Zwecke der internationalen Recherche eingereicht worden ist (nach Regel 23.1(b)).
- ☐ die Veröffentlichungssprache der internationalen Anmeldung (nach Regel 48.3(b)).
- ☐ die Sprache der Übersetzung, die für die Zwecke der internationalen vorläufigen Prüfung eingereicht worden ist (nach Regel 55.2 und/oder 55.3).

3. Hinsichtlich der in der internationalen Anmeldung offenbarten **Nucleotid- und/oder Aminosäuresequenz** ist die internationale vorläufige Prüfung auf der Grundlage des Sequenzprotokolls durchgeführt worden, das:

- ☐ in der internationalen Anmeldung in schriftlicher Form enthalten ist.
- ☐ zusammen mit der internationalen Anmeldung in computerlesbarer Form eingereicht worden ist.
- ☐ bei der Behörde nachträglich in schriftlicher Form eingereicht worden ist.
- ☐ bei der Behörde nachträglich in computerlesbarer Form eingereicht worden ist.
- ☐ Die Erklärung, dass das nachträglich eingereichte schriftliche Sequenzprotokoll nicht über den Offenbarungsgehalt der internationalen Anmeldung im Anmeldezeitpunkt hinausgeht, wurde vorgelegt.
- ☐ Die Erklärung, dass die in computerlesbarer Form erfassten Informationen dem schriftlichen Sequenzprotokoll entsprechen, wurde vorgelegt.

4. Aufgrund der Änderungen sind folgende Unterlagen fortgefallen:

- ☐ Beschreibung, Seiten:
- ☐ Ansprüche, Nr.:
- ☐ Zeichnungen, Blatt:

INTERNATIONALER VORLÄUFIGER PRÜFUNGSBERICHT

Internationales Aktenzeichen PCT/DE99/03747

5. ☐ Dieser Bericht ist ohne Berücksichtigung (von einigen) der Änderungen erstellt worden, da diese aus den angegebenen Gründen nach Auffassung der Behörde über den Offenbarungsgehalt in der ursprünglich eingereichten Fassung hinausgehen (Regel 70.2(c)).

(Auf Ersatzblätter, die solche Änderungen enthalten, ist unter Punkt 1 hinzuweisen; sie sind diesem Bericht beizufügen).

6. Etwaige zusätzliche Bemerkungen:

III. Keine Erstellung eines Gutachtens über Neuheit, erfinderische Tätigkeit und gewerbliche Anwendbarkeit

Folgende Teile der Anmeldung wurden nicht daraufhin geprüft, ob die beanspruchte Erfindung als neu, auf erfinderischer Tätigkeit beruhend (nicht offensichtlich) und gewerblich anwendbar anzusehen ist:

☐ die gesamte internationale Anmeldung.

☒ Ansprüche Nr. 25.

Begründung:

☐ Die gesamte internationale Anmeldung, bzw. die obengenannten Ansprüche Nr. beziehen sich auf den nachstehenden Gegenstand, für den keine internationale vorläufige Prüfung durchgeführt werden braucht (*genaue Angaben*):

☒ Die Beschreibung, die Ansprüche oder die Zeichnungen (*machen Sie hierzu nachstehend genaue Angaben*) oder die obengenannten Ansprüche Nr. 25 sind so unklar, daß kein sinnvolles Gutachten erstellt werden konnte (*genaue Angaben*):
siehe Beiblatt

☐ Die Ansprüche bzw. die obengenannten Ansprüche Nr. sind so unzureichend durch die Beschreibung gestützt, daß kein sinnvolles Gutachten erstellt werden konnte.

☐ Für die obengenannten Ansprüche Nr. wurde kein internationaler Recherchenbericht erstellt.

2. Eine sinnvolle internationale vorläufige Prüfung kann nicht durchgeführt werden, weil das Protokoll der Nukleotid- und/oder Aminosäuresequenzen nicht dem in Anlage C der Verwaltungsvorschriften vorgeschriebenen Standard entspricht:

☐ Die schriftliche Form wurde nicht eingereicht bzw. entspricht nicht dem Standard.

☐ Die computerlesbare Form wurde nicht eingereicht bzw. entspricht nicht dem Standard.

V. Begründete Feststellung nach Artikel 35(2) hinsichtlich der Neuheit, der erfinderischen Tätigkeit und der gewerblichen Anwendbarkeit; Unterlagen und Erklärungen zur Stützung dieser Feststellung

1. Feststellung

INTERNATIONALER VORLÄUFIGER PRÜFUNGSBERICHT

Internationales Aktenzeichen PCT/DE99/03747

Neuheit (N)	Ja: Ansprüche	1-24, 26-27, 29
	Nein: Ansprüche	28
Erfinderische Tätigkeit (ET)	Ja: Ansprüche	1-24, 26-27
	Nein: Ansprüche	28-29
Gewerbliche Anwendbarkeit (GA)	Ja: Ansprüche	1-24, 26-29
	Nein: Ansprüche	

2. Unterlagen und Erklärungen
siehe Beiblatt

VI. Bestimmte angeführte Unterlagen

1. Bestimmte veröffentlichte Unterlagen (Regel 70.10)

und / oder

2. Nicht-schriftliche Offenbarungen (Regel 70.9)

siehe Beiblatt

VIII. Bestimmte Bemerkungen zur internationalen Anmeldung

Zur Klarheit der Patentansprüche, der Beschreibung und der Zeichnungen oder zu der Frage, ob die Ansprüche in vollem Umfang durch die Beschreibung gestützt werden, ist folgendes zu bemerken:

siehe Beiblatt

PUNKT III:

Die Formulierung des **Anspruchs 25** ist unklar, weil der Ausdruck "daß man eine amplifizierte DNA-Probe [...] in einem zweiten Durchlauf des Verfahrens selbst eine DNA-Probe [...] wird" unverständlich ist. Aufgrund dieser Unklarheit sind die Merkmale des entsprechenden Verfahrens derart unverständlich, so daß **Anspruch 25** nicht geprüft werden kann.

Bezugnehmend auf den Brief des Anmelder vom 18. Oktober 2000 ist die Internationale Vorläufige Prüfungsbehörde der Meinung, daß die Unklarheit des Anspruchs 25 weniger durch einen typographischen Fehler ("Schritt c)" oder "Schritt e)") verursacht wird als vielmehr dadurch, daß der Ausdruck "daß man eine [...] Probe [...] selbst eine DNA-Probe [...] wird" grammatikalisch unverständlich ist.

PUNKT V:

Es wird auf die folgenden Dokumente verwiesen:

- D1: WO 97 46705 A (Johns Hopkins University), 11. Dezember 1997;
- D2: WO 93 22457 A (Massachusetts Inst. of Technology), 11. November 1993;
- D3: NUCLEIC ACIDS RESEARCH (Warnecke et al.), Bd. 25, Nr. 21, 1997, Seiten 4422-4426.

1. NEUHEIT

1.1 Anspruch 28 erfüllt aus folgenden Gründen nicht die Erfordernisse des Artikels 33(2) PCT:

Ein Kit, das zur Durchführung eines Verfahrens nach Anspruch 1 der vorliegenden Anmeldung geeignet ist und das DNA, Kontroll-DNA sowie Reagenzien zum Aufzeigen variabler Methylierungsmuster enthält, ist in Dokument D1 offenbart (Seite 37, Zeile 22, bis Seite 38, Zeile 13; Ansprüche 15- 19 und 22).

Die Internationale Vorläufige Prüfungsbehörde teilt nicht die im Brief des Anmelders vom 18. Oktober 2000 geäußerte Meinung, daß das Kit nach D1 zur Durchführung des Verfahrens nach Anspruch 1 der vorliegenden Anmeldung nicht geeignet sei. Obwohl die Ausbildung eines Heteroduplexes tatsächlich kein essentielles Merkmal des Verfahrens nach D1 darstellt (im Gegensatz zum Verfahren des vorliegenden Anspruchs 1), erlauben die Komponenten des Kits von D1 (CpG-spezifische Primer, Kontroll-DNA und Reagenzien zur Modifikation von unmethyliertem Cytosin) die Durchführung des Verfahrens nach Anspruch 1 (inkl. der Bildung eines Heteroduplexes). Das Kit nach D1 ist daher zur Durchführung dieses Verfahrens geeignet (PCT-Richtlinien III-4.8).

- 1.2 Die verbleibenden **Ansprüche 1-24, 26-27 und 29** sind neu im Sinne des Artikels 33(2) PCT, weil der verfügbare Stand der Technik keine Verfahren und Kits mit allen Merkmalen dieser Ansprüche offenbart.

2. ERFINDERISCHE TÄTIGKEIT

Jedoch erfüllt **Anspruch 29** aus folgenden Gründen nicht die Erfordernisse des Artikels 33(3) PCT:

- 2.1 Verglichen mit dem Kit aus Dokument D1 unterscheidet sich das Kit des vorliegenden **Anspruchs 29** nur dadurch, daß es vollständig methylierte und/oder demethylierte DNA umfaßt. Die Aufnahme einer solchen Kontroll-DNA in ein Kit liegt jedoch im Rahmen dessen, was ein Fachmann aufgrund der ihm geläufigen Überlegungen zu tun pflegt (siehe z.B. D3, Seite 4122, rechte Spalte). Folglich scheint dem Gegenstand des Anspruchs 29 keine erfinderische Tätigkeit zugrunde zu liegen.
- 2.2 Im Gegensatz hierzu scheinen die **Ansprüche 1-24 und 26-27** aus folgenden Gründen erfinderisch im Sinne des Artikels 33(3) PCT zu sein:

Dokument D1, das als nächstliegender Stand der Technik angesehen wird, offenbart ein Verfahren zur Identifizierung von 5-Methylcytosin-Positionen mit allen Merkmalen der Schritte a) bis c) des vorliegenden **Anspruchs 1** (Ansprüche 1-4). Hiervon unterscheidet sich der Gegenstand des Anspruchs 1 dadurch, daß aus den Amplifikaten der Schritte b) und c) Heteroduplexe gebildet werden, deren nicht-komplementären Basenpaare spezifisch markiert werden (Schritte d) und e)). Dieser Unterschied erlaubt eine schnelle Identifizierung von methylierten Cytosinen ohne Sequenzierung der amplifizierten DNA-Moleküle.

Ausgehend von D1 kann die mit Anspruch 1 zu lösende Aufgabe somit darin gesehen werden, ein alternatives und vereinfachtes Verfahren zur Identifizierung von methylierten Cytosinen in genomischer DNA bereitzustellen.

Die Internationale Vorläufige Prüfungsbehörde stimmt dem Argument des Anmelders (Brief vom 18. Oktober 2000) zu, daß die verfügbare Stand der Technik (inkl. des Dokuments D2) keine Hinweise auf die Bildung von Heteroduplexen aufgrund von asymmetrischer Methylierung enthält. Für den Fachmann war es daher tatsächlich nicht naheliegend, die Bildung und Detektion eines Heteroduplexes in das Nachweisverfahren für methylierte Cytosine aus D1 aufzunehmen und somit alle in Anspruch 1 aufgeführten Merkmale miteinander zu kombinieren. Der Gegenstand des **Anspruchs 1** scheint somit auf einer erfinderischen Tätigkeit im Sinne des Artikels 33(3) PCT zu beruhen.

- 2.3 Die **Ansprüche 2-24 und 26-27** sind vom Anspruch 1 abhängig und erfüllen damit ebenfalls die Erfordernisse des PCT in bezug auf Neuheit und erfinderische Tätigkeit.

3. INDUSTRIELLE ANWENDBARKEIT

Der Gegenstand der **Ansprüche 1-24 und 26-29** scheint gewerblich anwendbar zu sein und erfüllt somit die Erfordernisse des Artikels 33(4) PCT.

PUNKT VI:

Bestimmte veröffentlichte Unterlagen (Regel 70.10):

Anmelde Nr. Patent Nr.	Veröffentlichungsdatum (Tag/Monat/Jahr)	Anmeldedatum (Tag/Monat/Jahr)	Prioritätsdatum (zu Recht beansprucht) (Tag/Monat/Jahr)
WO 99 28498 A	10. Juni 1999	27. Nov. 1998	27. Nov. 1997

Das genannten Patent (P-Dokument) wurden nach dem Prioritätsdatum, aber vor dem Einreichungsdatum der vorliegenden Patentanmeldung veröffentlicht. Da der Prioritätsanspruch der vorliegenden Anmeldung gültig zu sein scheint, ist das genannte P-Dokument in der Internationalen Phase nicht relevant. In der Regionalen Phase der vorliegenden Anmeldung kann es jedoch zum relevanten Stand der Technik gehören.

PUNKT VIII:

1. Der **Anspruch 1** entspricht nicht den Erfordernissen des Artikels 6 PCT, weil der Gegenstand des Schutzbegehrens nicht klar definiert ist. In Schritt a) des Anspruchs wird versucht, den Gegenstand durch das zu erreichende Ergebnis zu definieren ("behandelt [...] chemisch derart, daß Cytosin und 5-Methylcytosin unterschiedlich reagieren"). Damit wird aber lediglich die zu lösende Aufgabe angegeben.
2. Schritt b) des **Anspruchs 1** bezieht sich auf "denselben Nukleinsäure-Abschnitt", obwohl Anspruch 1 keinen solchen Abschnitt erwähnt. Dies hat zur Folge, daß die Definition des Gegenstands des Anspruchs 1 nicht klar ist (Artikel 6 PCT).
3. **Anspruch 6** erfüllt nicht die Erfordernisse des Artikels 6 PCT bzgl. Knappheit, weil er kein Merkmal enthält, das über die Merkmale des Anspruchs 1 hinausgeht.

4. Der in den **Ansprüchen 9 und 10** benutzte Ausdruck "hinreichend selektiv" ist vage und unklar und läßt den Leser über die technischen Merkmale der betreffenden Rückgratspaltung im Ungewissen. Dies hat zur Folge, daß die Definition des Gegenstands dieser Ansprüche nicht klar ist (Artikel 6 PCT).
5. **Anspruch 11** ist unklar, weil er sich auf DNA-Fragmente gemäß Schritt e) des Anspruchs 1 bezieht, obwohl dieser Schritt keine DNA-Fragmente erwähnt.
6. **Anspruch 15** ist ebenfalls unklar, weil er sich auf "die Größe der im Schritt e) gemäß Anspruch 1 erzeugten Fragmente" bezieht, obwohl Schritt e) des Anspruchs 1 keine solchen Fragmente erwähnt.
7. **Anspruch 17** ist unklar (Artikel 6 PCT), weil die Bedeutung des Ausdrucks "um den maximal nachweisbaren Massenbereich" unklar ist.
8. Die **Ansprüche 18-20** sind unklar, weil sie sich die PCR-Primer bzw. -Produkte gemäß der Ansprüche 1 oder 2 beziehen, obwohl diese Ansprüche keine solchen PCR-Primer bzw. -Produkte erwähnen.
9. Der in **Anspruch 27** benutzte Ausdruck "unspezifischere Variante" ist vage und unklar und läßt den Leser über die technischen Merkmale des betreffenden Verfahrens im Ungewissen. Dies hat zur Folge, daß die Definition des Gegenstands dieses Anspruchs nicht klar ist (Artikel 6 PCT).
10. Ein analoger Einwand gilt für den Ausdruck "zwei möglichst verschiedenen" in **Anspruch 28**.
11. **Ansprüche 28-29** sind unklar und erfüllen die Erfordernisse des Artikels 6 PCT insofern nicht, als der Gegenstand des Schutzbegehrens nicht klar definiert ist. Die funktionellen Angaben "Reagenzien um [...] aufzuzeigen" bzw. "Reagenzien, die [...] erforderlich sind" ermöglichen es einem Fachmann nicht, festzustellen, welche chemischen Merkmale notwendig sind, um die genannten Funktionen durchzuführen.

(51) Internationale Patentklassifikation ⁷ : C12Q 1/68		A3	(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 00/31294
			(43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 2. Juni 2000 (02.06.00)
(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/DE99/03747 (22) Internationales Anmeldedatum: 19. November 1999 (19.11.99) (30) Prioritätsdaten: 198 53 398.5 19. November 1998 (19.11.98) DE (71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): EPIGE- NOMICS GMBH [DE/DE]; Kastanienallee 24, D-10435 Berlin (DE). (72) Erfinder; und (75) Erfinder/Anmelder (nur für US): BERLIN, Kathrin [DE/DE]; Marienkäferweg 4, D-14532 Stahnsdorf (DE). (74) Anwalt: SCHUBERT, Klemens; Joachimstrasse 9, D-10119 Berlin-Mitte (DE).		(81) Bestimmungsstaaten: AE, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW, ARIPO Patent (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG). Veröffentlicht Mit internationalem Recherchenbericht. (88) Veröffentlichungsdatum des internationalen Recherchenbe- richts: 19. Oktober 2000 (19.10.00)	
(54) Title: <u>METHOD FOR IDENTIFYING CYTOSINE METHYLATION PATTERNS IN GENOMIC DNA</u>			
(54) Bezeichnung: VERFAHREN ZUR IDENTIFIKATION VON CYTOSIN-METHYLIERUNGSMUSTERN IN GENOMISCHER DNA			
(57) Abstract			
<p>The invention relates to a method for identifying 5-methylcytosine positions in genomic DNA. The method is characterised by the following steps: a) the genomic DNA of a cell, a cell line, a tissue or an individual is chemically treated in such a way that the cytosine and 5-methylcytosine react differently and the two products present different base pairing behaviour in the duplex; b) the same nucleic acid section is amplified by means of a polymerase reaction; c) the same nucleic acid section of at least one other cell, cell line, tissue or individual or of any given reference DNA is treated according to steps a) and b); d) heteroduplexes are formed from the at least two amplification products obtained in steps b) and c); and e) a detectable marking is introduced into the heteroduplexes by means of a reaction that is specific to non-complementary base pairs.</p>			
(57) Zusammenfassung			
<p>Beschrieben ist ein Verfahren zur Identifikation von 5-Methylcytosin-Positionen in genomischer DNA, welches dadurch gekennzeichnet ist, daß folgende Verfahrensschritte ausgeführt werden: a) die genomische DNA einer Zelle, einer Zelllinie, eines Gewebes oder eines Individuums wird chemisch so behandelt, daß Cytosin und 5-Methylcytosin unterschiedlich reagieren und sich in der Duplex ein unterschiedliches Basenpaarungsverhalten der beiden Produkte ergibt, b) derselbe Nukleinsäure-Abschnitt mittels einer Polymerasereaktion amplifiziert wird, c) der gleiche Nukleinsäure-Abschnitt mindestens einer weiteren Zelle, Zelllinie, Gewebes oder Individuums oder einer beliebigen Referenz-DNA entsprechend den Punkten a) und b) behandelt wird, d) aus den mindestens zwei Amplifikaten der Punkte b) und c) Heteroduplexes gebildet werden, e) durch eine Reaktion, die spezifisch ist für nicht komplementäre Basenpaare, eine aufzeigbare Markierung in die Heteroduplex eingeführt wird.</p>			

VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS

PCT No. 13 MAY 2001

INTERNATIONALER VORLÄUFIGER PRÜFUNGSBERICHT

(Artikel 36 und Regel 70 PCT)

Aktenzeichen des Anmelders oder Anwalts ?	WEITERES VORGEHEN siehe Mitteilung über die Übersendung des internationalen vorläufigen Prüfungsbericht (Formblatt PCT/IPEA/416)	
Internationales Aktenzeichen PCT/DE99/03747	Internationales Anmeldedatum (Tag/Monat/Jahr) 19/11/1999	Prioritätsdatum (Tag/Monat/Tag) 19/11/1998
Internationale Patentklassifikation (IPK) oder nationale Klassifikation und IPK C12Q1/68		
Anmelder EPIGENOMICS GMBH et al.		



- Dieser internationale vorläufige Prüfungsbericht wurde von der mit der internationale vorläufigen Prüfung beauftragte Behörde erstellt und wird dem Anmelder gemäß Artikel 36 übermittelt.
- Dieser BERICHT umfaßt insgesamt 9 Blätter einschließlich dieses Deckblatts.

☐ Außerdem liegen dem Bericht ANLAGEN bei; dabei handelt es sich um Blätter mit Beschreibungen, Ansprüchen und/oder Zeichnungen, die geändert wurden und diesem Bericht zugrunde liegen, und/oder Blätter mit vor dieser Behörde vorgenommenen Berichtigungen (siehe Regel 70.16 und Abschnitt 607 der Verwaltungsrichtlinien zum PCT).

Diese Anlagen umfassen insgesamt Blätter.

- Dieser Bericht enthält Angaben zu folgenden Punkten:

- I ☒ Grundlage des Berichts
- II ☐ Priorität
- III ☒ Keine Erstellung eines Gutachtens über Neuheit, erfinderische Tätigkeit und gewerbliche Anwendbarkeit
- IV ☐ Mangelnde Einheitlichkeit der Erfindung
- V ☒ Begründete Feststellung nach Artikel 35(2) hinsichtlich der Neuheit, der erfinderische Tätigkeit und der gewerbliche Anwendbarkeit; Unterlagen und Erklärungen zur Stützung dieser Feststellung
- VI ☒ Bestimmte angeführte Unterlagen
- VII ☐ Bestimmte Mängel der internationalen Anmeldung
- VIII ☒ Bestimmte Bemerkungen zur internationalen Anmeldung

Datum der Einreichung des Antrags 19/06/2000	Datum der Fertigstellung dieses Berichts 05.12.2000
Name und Postanschrift der mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragten Behörde:  Europäisches Patentamt D-80298 München Tel. +49 89 2399 - 0 Tx: 523656 epmu d Fax: +49 89 2399 - 4465	Bevollmächtigter Bediensteter Barz, W Tel. Nr. +49 89 2399 7320 

INTERNATIONALER VORLÄUFIGER PRÜFUNGSBERICHT

Internationales Aktenzeichen PCT/DE99/03747

I. Grundlage des Berichts

1. Dieser Bericht wurde erstellt auf der Grundlage (*Ersatzblätter, die dem Anmeldeamt auf eine Aufforderung nach Artikel 14 hin vorgelegt wurden, gelten im Rahmen dieses Berichts als "ursprünglich eingereicht" und sind ihm nicht beigelegt, weil sie keine Änderungen enthalten.*):

Beschreibung, Seiten:

1-21 ursprüngliche Fassung

Patentansprüche, Nr.:

1-29 ursprüngliche Fassung

2. Hinsichtlich der **Sprache**: Alle vorstehend genannten Bestandteile standen der Behörde in der Sprache, in der die internationale Anmeldung eingereicht worden ist, zur Verfügung oder wurden in dieser eingereicht, sofern unter diesem Punkt nichts anderes angegeben ist.

Die Bestandteile standen Behörde in der Sprache: , zur Verfügung bzw. wurden in dieser Sprache eingereicht; dabei handelt es sich um

- ☐ die Sprache der Übersetzung, die für die Zwecke der internationalen Recherche eingereicht worden ist (nach Regel 23.1(b)).
- ☐ die Veröffentlichungssprache der internationalen Anmeldung (nach Regel 48.3(b)).
- ☐ die Sprache der Übersetzung, die für die Zwecke der internationalen vorläufigen Prüfung eingereicht worden ist (nach Regel 55.2 und/oder 55.3).

3. Hinsichtlich der in der internationalen Anmeldung offenbaren **Nucleotid- und/oder Aminosäuresequenz** ist die internationale vorläufige Prüfung auf der Grundlage des Sequenzprotokolls durchgeführt worden, das:

- ☐ in der internationalen Anmeldung in schriftlicher Form enthalten ist.
- ☐ zusammen mit der internationalen Anmeldung in computerlesbarer Form eingereicht worden ist.
- ☐ bei der Behörde nachträglich in schriftlicher Form eingereicht worden ist.
- ☐ bei der Behörde nachträglich in computerlesbarer Form eingereicht worden ist.
- ☐ Die Erklärung, dass das nachträglich eingereichte schriftliche Sequenzprotokoll nicht über den Offenbarungsgehalt der internationalen Anmeldung im Anmeldezeitpunkt hinausgeht, wurde vorgelegt.
- ☐ Die Erklärung, dass die in computerlesbarer Form erfassten Informationen dem schriftlichen Sequenzprotokoll entsprechen, wurde vorgelegt.

4. Aufgrund der Änderungen sind folgende Unterlagen fortgefallen:

- ☐ Beschreibung, Seiten:
- ☐ Ansprüche, Nr.:
- ☐ Zeichnungen, Blatt:

INTERNATIONALER VORLÄUFIGER PRÜFUNGSBERICHT

Internationales Aktenzeichen PCT/DE99/03747

5. ☐ Dieser Bericht ist ohne Berücksichtigung (von einigen) der Änderungen erstellt worden, da diese aus den angegebenen Gründen nach Auffassung der Behörde über den Offenbarungsgehalt in der ursprünglich eingereichten Fassung hinausgehen (Regel 70.2(c)).

(Auf Ersatzblätter, die solche Änderungen enthalten, ist unter Punkt 1 hinzuweisen; sie sind diesem Bericht beizufügen).

6. Etwaige zusätzliche Bemerkungen:

III. Keine Erstellung eines Gutachtens über Neuheit, erfinderische Tätigkeit und gewerbliche Anwendbarkeit

Folgende Teile der Anmeldung wurden nicht daraufhin geprüft, ob die beanspruchte Erfindung als neu, auf erfinderischer Tätigkeit beruhend (nicht offensichtlich) und gewerblich anwendbar anzusehen ist:

- ☐ die gesamte internationale Anmeldung.
- ☒ Ansprüche Nr. 25.

Begründung:

- ☐ Die gesamte internationale Anmeldung, bzw. die obengenannten Ansprüche Nr. beziehen sich auf den nachstehenden Gegenstand, für den keine internationale vorläufige Prüfung durchgeführt werden braucht (*genaue Angaben*):
- ☒ Die Beschreibung, die Ansprüche oder die Zeichnungen (*machen Sie hierzu nachstehend genaue Angaben*) oder die obengenannten Ansprüche Nr. 25 sind so unklar, daß kein sinnvolles Gutachten erstellt werden konnte (*genaue Angaben*):
siehe Beiblatt
- ☐ Die Ansprüche bzw. die obengenannten Ansprüche Nr. sind so unzureichend durch die Beschreibung gestützt, daß kein sinnvolles Gutachten erstellt werden konnte.
- ☐ Für die obengenannten Ansprüche Nr. wurde kein internationaler Recherchenbericht erstellt.
2. Eine sinnvolle internationale vorläufige Prüfung kann nicht durchgeführt werden, weil das Protokoll der Nukleotid- und/oder Aminosäuresequenzen nicht dem in Anlage C der Verwaltungsvorschriften vorgeschriebenen Standard entspricht:
- ☐ Die schriftliche Form wurde nicht eingereicht bzw. entspricht nicht dem Standard.
- ☐ Die computerlesbare Form wurde nicht eingereicht bzw. entspricht nicht dem Standard.

V. Begründete Feststellung nach Artikel 35(2) hinsichtlich der Neuheit, der erfinderischen Tätigkeit und der gewerblichen Anwendbarkeit; Unterlagen und Erklärungen zur Stützung dieser Feststellung

1. Feststellung

INTERNATIONALER VORLÄUFIGER PRÜFUNGSBERICHT

Internationales Aktenzeichen PCT/DE99/03747

Neuheit (N)	Ja: Ansprüche	1-24, 26-27, 29
	Nein: Ansprüche	28
Erfinderische Tätigkeit (ET)	Ja: Ansprüche	1-24, 26-27
	Nein: Ansprüche	28-29
Gewerbliche Anwendbarkeit (GA)	Ja: Ansprüche	1-24, 26-29
	Nein: Ansprüche	

2. Unterlagen und Erklärungen
siehe Beiblatt

VI. Bestimmte angeführte Unterlagen

1. Bestimmte veröffentlichte Unterlagen (Regel 70.10)

und / oder

2. Nicht-schriftliche Offenbarungen (Regel 70.9)

siehe Beiblatt

VIII. Bestimmte Bemerkungen zur internationalen Anmeldung

Zur Klarheit der Patentansprüche, der Beschreibung und der Zeichnungen oder zu der Frage, ob die Ansprüche in vollem Umfang durch die Beschreibung gestützt werden, ist folgendes zu bemerken:

siehe Beiblatt

PUNKT III:

Die Formulierung des **Anspruchs 25** ist unklar, weil der Ausdruck "daß man eine amplifizierte DNA-Probe [...] in einem zweiten Durchlauf des Verfahrens selbst eine DNA-Probe [...] wird" unverständlich ist. Aufgrund dieser Unklarheit sind die Merkmale des entsprechenden Verfahrens derart unverständlich, so daß **Anspruch 25** nicht geprüft werden kann.

Bezugnehmend auf den Brief des Anmelder vom 18. Oktober 2000 ist die Internationale Vorläufige Prüfungsbehörde der Meinung, daß die Unklarheit des **Anspruchs 25** weniger durch einen typographischen Fehler ("Schritt c)" oder "Schritt e)") verursacht wird als vielmehr dadurch, daß der Ausdruck "daß man eine [...] Probe [...] selbst eine DNA-Probe [...] wird" grammatikalisch unverständlich ist.

PUNKT V:

Es wird auf die folgenden Dokumente verwiesen:

- D1: WO 97 46705 A (Johns Hopkins University), 11. Dezember 1997;
- D2: WO 93 22457 A (Massachusetts Inst. of Technology), 11. November 1993;
- D3: NUCLEIC ACIDS RESEARCH (Warnecke et al.), Bd. 25, Nr. 21, 1997, Seiten 4422-4426.

1. NEUHEIT

1.1 Anspruch 28 erfüllt aus folgenden Gründen nicht die Erfordernisse des Artikels 33(2) PCT:

Ein Kit, das zur Durchführung eines Verfahrens nach **Anspruch 1** der vorliegenden Anmeldung geeignet ist und das DNA, Kontroll-DNA sowie Reagenzien zum Aufzeigen variabler Methylierungsmuster enthält, ist in Dokument D1 offenbart (Seite 37, Zeile 22, bis Seite 38, Zeile 13; Ansprüche 15- 19 und 22).

Die Internationale Vorläufige Prüfungsbehörde teilt nicht die im Brief des Anmelders vom 18. Oktober 2000 geäußerte Meinung, daß das Kit nach D1 zur Durchführung des Verfahrens nach Anspruch 1 der vorliegenden Anmeldung nicht geeignet sei. Obwohl die Ausbildung eines Heteroduplexes tatsächlich kein essentielles Merkmal des Verfahrens nach D1 darstellt (im Gegensatz zum Verfahren des vorliegenden Anspruchs 1), erlauben die Komponenten des Kits von D1 (CpG-spezifische Primer, Kontroll-DNA und Reagenzien zur Modifikation von unmethyliertem Cytosin) die Durchführung des Verfahrens nach Anspruch 1 (inkl. der Bildung eines Heteroduplexes). Das Kit nach D1 ist daher zur Durchführung dieses Verfahrens geeignet (PCT-Richtlinien III-4.8).

- 1.2 Die verbleibenden **Ansprüche 1-24, 26-27 und 29** sind neu im Sinne des Artikels 33(2) PCT, weil der verfügbare Stand der Technik keine Verfahren und Kits mit allen Merkmalen dieser Ansprüche offenbart.

2. ERFINDERISCHE TÄTIGKEIT

Jedoch erfüllt **Anspruch 29** aus folgenden Gründen nicht die Erfordernisse des Artikels 33(3) PCT:

- 2.1 Verglichen mit dem Kit aus Dokument D1 unterscheidet sich das Kit des vorliegenden **Anspruchs 29** nur dadurch, daß es vollständig methylierte und/oder demethylierte DNA umfaßt. Die Aufnahme einer solchen Kontroll-DNA in ein Kit liegt jedoch im Rahmen dessen, was ein Fachmann aufgrund der ihm geläufigen Überlegungen zu tun pflegt (siehe z.B. D3, Seite 4122, rechte Spalte). Folglich scheint dem Gegenstand des Anspruchs 29 keine erfinderische Tätigkeit zugrunde zu liegen.
- 2.2 Im Gegensatz hierzu scheinen die **Ansprüche 1-24 und 26-27** aus folgenden Gründen erfinderisch im Sinne des Artikels 33(3) PCT zu sein:

Dokument D1, das als nächstliegender Stand der Technik angesehen wird, offenbart ein Verfahren zur Identifizierung von 5-Methylcytosin-Positionen mit allen Merkmalen der Schritte a) bis c) des vorliegenden **Anspruchs 1** (Ansprüche 1-4). Hiervon unterscheidet sich der Gegenstand des Anspruchs 1 dadurch, daß aus den Amplifikaten der Schritte b) und c) Heteroduplexe gebildet werden, deren nicht-komplementären Basenpaare spezifisch markiert werden (Schritte d) und e)). Dieser Unterschied erlaubt eine schnelle Identifizierung von methylierten Cytosinen ohne Sequenzierung der amplifizierten DNA-Moleküle.

Ausgehend von D1 kann die mit Anspruch 1 zu lösende Aufgabe somit darin gesehen werden, ein alternatives und vereinfachtes Verfahren zur Identifizierung von methylierten Cytosinen in genomischer DNA bereitzustellen.

Die Internationale Vorläufige Prüfungsbehörde stimmt dem Argument des Anmelders (Brief vom 18. Oktober 2000) zu, daß die verfügbare Stand der Technik (inkl. des Dokuments D2) keine Hinweise auf die Bildung von Heteroduplexen aufgrund von asymmetrischer Methylierung enthält. Für den Fachmann war es daher tatsächlich nicht naheliegend, die Bildung und Detektion eines Heteroduplexes in das Nachweisverfahren für methylierte Cytosine aus D1 aufzunehmen und somit alle in Anspruch 1 aufgeführten Merkmale miteinander zu kombinieren. Der Gegenstand des **Anspruchs 1** scheint somit auf einer erfinderischen Tätigkeit im Sinne des Artikels 33(3) PCT zu beruhen.

- 2.3 Die **Ansprüche 2-24 und 26-27** sind vom Anspruch 1 abhängig und erfüllen damit ebenfalls die Erfordernisse des PCT in Bezug auf Neuheit und erfinderische Tätigkeit.

3. INDUSTRIELLE ANWENDBARKEIT

Der Gegenstand der **Ansprüche 1-24 und 26-29** scheint gewerblich anwendbar zu sein und erfüllt somit die Erfordernisse des Artikels 33(4) PCT.

PUNKT VI:

Bestimmte veröffentlichte Unterlagen (Regel 70.10):

Anmelde Nr. Patent Nr.	Veröffentlichungsdatum (Tag/Monat/Jahr)	Anmeldedatum (Tag/Monat/Jahr)	Prioritätsdatum (zu Recht beansprucht) (Tag/Monat/Jahr)
WO 99 28498 A	10. Juni 1999	27. Nov. 1998	27. Nov. 1997

Das genannten Patent (P-Dokument) wurden nach dem Prioritätsdatum, aber vor dem Einreichungsdatum der vorliegenden Patentanmeldung veröffentlicht. Da der Prioritätsanspruch der vorliegenden Anmeldung gültig zu sein scheint, ist das genannte P-Dokument in der Internationalen Phase nicht relevant. In der Regionalen Phase der vorliegenden Anmeldung kann es jedoch zum relevanten Stand der Technik gehören.

PUNKT VIII:

1. Der **Anspruch 1** entspricht nicht den Erfordernissen des Artikels 6 PCT, weil der Gegenstand des Schutzbegehrens nicht klar definiert ist. In Schritt a) des Anspruchs wird versucht, den Gegenstand durch das zu erreichende Ergebnis zu definieren ("behandelt [...] chemisch derart, daß Cytosin und 5-Methylcytosin unterschiedlich reagieren"). Damit wird aber lediglich die zu lösende Aufgabe angegeben.
2. Schritt b) des **Anspruchs 1** bezieht sich auf "denselben Nukleinsäure-Abschnitt", obwohl Anspruch 1 keinen solchen Abschnitt erwähnt. Dies hat zur Folge, daß die Definition des Gegenstands des Anspruchs 1 nicht klar ist (Artikel 6 PCT).
3. **Anspruch 6** erfüllt nicht die Erfordernisse des Artikels 6 PCT bzgl. Knappheit, weil er kein Merkmal enthält, das über die Merkmale des Anspruchs 1 hinausgeht.

4. Der in den **Ansprüchen 9 und 10** benutzte Ausdruck "hinreichend selektiv" ist vage und unklar und läßt den Leser über die technischen Merkmale der betreffenden Rückgratspaltung im Ungewissen. Dies hat zur Folge, daß die Definition des Gegenstands dieser Ansprüche nicht klar ist (Artikel 6 PCT).
5. **Anspruch 11** ist unklar, weil er sich auf DNA-Fragmente gemäß Schritt e) des Anspruchs 1 bezieht, obwohl dieser Schritt keine DNA-Fragmente erwähnt.
6. **Anspruch 15** ist ebenfalls unklar, weil er sich auf "die Größe der im Schritt e) gemäß Anspruch 1 erzeugten Fragmente" bezieht, obwohl Schritt e) des Anspruchs 1 keine solchen Fragmente erwähnt.
7. **Anspruch 17** ist unklar (Artikel 6 PCT), weil die Bedeutung des Ausdrucks "um den maximal nachweisbaren Massenbereich" unklar ist.
8. Die **Ansprüche 18-20** sind unklar, weil sie sich die PCR-Primer bzw. -Produkte gemäß der Ansprüche 1 oder 2 beziehen, obwohl diese Ansprüche keine solchen PCR-Primer bzw. -Produkte erwähnen.
9. Der in **Anspruch 27** benutzte Ausdruck "unspezifischere Variante" ist vage und unklar und läßt den Leser über die technischen Merkmale des betreffenden Verfahrens im Ungewissen. Dies hat zur Folge, daß die Definition des Gegenstands dieses Anspruchs nicht klar ist (Artikel 6 PCT).
10. Ein analoger Einwand gilt für den Ausdruck "zwei möglichst verschiedenen" in **Anspruch 28**.
11. **Ansprüche 28-29** sind unklar und erfüllen die Erfordernisse des Artikels 6 PCT insofern nicht, als der Gegenstand des Schutzbegehrens nicht klar definiert ist. Die funktionellen Angaben "Reagenzien um [...] aufzuzeigen" bzw. "Reagenzien, die [...] erforderlich sind" ermöglichen es einem Fachmann nicht, festzustellen, welche chemischen Merkmale notwendig sind, um die genannten Funktionen durchzuführen.

VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT
AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS

PCT

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

(Artikel 18 sowie Regeln 43 und 44 PCT)

Aktenzeichen des Anmelders oder Anwalts E01/1084/WO	WEITERES VORGEHEN siehe Mitteilung über die Übermittlung des internationalen Recherchenberichts (Formblatt PCT/ISA/220) sowie, soweit zutreffend, nachstehender Punkt 5	
Internationales Aktenzeichen PCT/DE 99/ 03747	Internationales Anmeldedatum (Tag/Monat/Jahr) 19/11/1999	(Frühestes) Prioritätsdatum (Tag/Monat/Jahr) 19/11/1998
Anmelder EPIGENOMICS GMBH et al.		

Dieser Internationale Recherchenbericht wurde von der Internationalen Recherchenbehörde erstellt und wird dem Anmelder gemäß Artikel 18 übermittelt. Eine Kopie wird dem Internationalen Büro übermittelt.

Dieser Internationale Recherchenbericht umfaßt insgesamt 4 Blätter.

☒ Darüber hinaus liegt ihm jeweils eine Kopie der in diesem Bericht genannten Unterlagen zum Stand der Technik bei.

1. Grundlage des Berichts

- a. Hinsichtlich der Sprache ist die Internationale Recherche auf der Grundlage der internationalen Anmeldung in der Sprache durchgeführt worden, in der sie eingereicht wurde, sofern unter diesem Punkt nichts anderes angegeben ist.

☐ Die Internationale Recherche ist auf der Grundlage einer bei der Behörde eingereichten Übersetzung der internationalen Anmeldung (Regel 23.1 b)) durchgeführt worden.

- b. Hinsichtlich der in der internationalen Anmeldung offenbarten Nucleotid- und/oder Aminosäuresequenz ist die Internationale Recherche auf der Grundlage des Sequenzprotokolls durchgeführt worden, das

☐ in der internationalen Anmeldung in schriftlicher Form enthalten ist.

☐ zusammen mit der internationalen Anmeldung in computerisierter Form eingereicht worden ist.

☐ bei der Behörde nachträglich in schriftlicher Form eingereicht worden ist.

☐ bei der Behörde nachträglich in computerisierter Form eingereicht worden ist.

☐ Die Erklärung, daß das nachträglich eingereichte schriftliche Sequenzprotokoll nicht über den Offenbarungsgehalt der internationalen Anmeldung im Anmeldezeitpunkt hinausgeht, wurde vorgelegt.

☐ Die Erklärung, daß die in computerisierter Form erfaßten Informationen dem schriftlichen Sequenzprotokoll entsprechen, wurde vorgelegt.

2. ☐ Bestimmte Ansprüche haben sich als nicht recherchierbar erwiesen (siehe Feld I).

3. ☐ Mangelnde Einheitlichkeit der Erfindung (siehe Feld II).

4. Hinsichtlich der Bezeichnung der Erfindung

☒ wird der vom Anmelder eingereichte Wortlaut genehmigt.

☐ wurde der Wortlaut von der Behörde wie folgt festgesetzt:

5. Hinsichtlich der Zusammenfassung

☒ wird der vom Anmelder eingereichte Wortlaut genehmigt.

☐ wurde der Wortlaut nach Regel 38.2b) in der in Feld III angegebenen Fassung von der Behörde festgesetzt. Der Anmelder kann der Behörde innerhalb eines Monats nach dem Datum der Absendung dieses internationalen Recherchenberichts eine Stellungnahme vorlegen.

6. Folgende Abbildung der Zeichnungen ist mit der Zusammenfassung zu veröffentlichen: Abb. Nr. ---

☐ wie vom Anmelder vorgeschlagen

☐ weil der Anmelder selbst keine Abbildung vorgeschlagen hat.

☐ weil diese Abbildung die Erfindung besser kennzeichnet.

☐ keine der Abb.

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES

IPK 7 C12Q1/68

Nach der internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

IPK 7 C12Q

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
Y	WO 97 33000 A (GENETRACE SYSTEMS INC) 12. September 1997 (1997-09-12) das ganze Dokument	1-29
Y	WO 97 46705 A (UNIV JOHNS HOPKINS MED) 11. Dezember 1997 (1997-12-11) das ganze Dokument	1-29
Y	WO 93 02216 A (UPSTATE BIOTECH INC) 4. Februar 1993 (1993-02-04) das ganze Dokument	1-29
Y	WO 93 22457 A (MASSACHUSETTS INST TECHNOLOGY) 11. November 1993 (1993-11-11) das ganze Dokument	1-29
	--- -/-	



Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen



Siehe Anhang Patentfamilie

* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

"A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

"E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

"L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

"O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

"P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfindertischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfindertischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann nahellegend ist

"&" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

23. Mai 2000

Absenddatum des internationalen Recherchenberichts

06/06/2000

Name und Postanschrift der internationalen Recherchenbehörde

Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Hagenmaier, S

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie°	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
Y	WARNECKE ET AL.: "DETECTION AND MEASUREMENT OF PCR BIAS IN QUANTITATIVE METHYLATION ANALYSIS OF BISULPHITE-TREATED DNA" NUCLEIC ACIDS RESEARCH, Bd. 25, Nr. 21, 1997, Seiten 4422-4426, XP002138268 das ganze Dokument	1-29
Y	XIONG Z AND LAIRD P W: "COBRA: a sensitive and quantitative DNA methylation assay" NUCLEIC ACIDS RESEARCH, GB, OXFORD UNIVERSITY PRESS, SURREY, Bd. 25, Nr. 12, 1997, Seiten 2532-2534-2534, XP002106407 ISSN: 0305-1048 das ganze Dokument	1-29
Y	PROSSER J: "DETECTING SINGLE-BASE MUTATIONS" TRENDS IN BIOTECHNOLOGY, GB, ELSEVIER PUBLICATIONS, CAMBRIDGE, Bd. 11, 1. Juni 1993 (1993-06-01), Seiten 238-246, XP000601507 ISSN: 0167-7799 das ganze Dokument	1-29
Y	PRIMROSE: "GENOMANALYSE" 1995, SPEKTRUM XP002138269 Seite 174 -Seite 179	1-29
A	GONZALGO M L AND JONES P A: "Rapid quantification of methylation differences at specific sites using methylation-sensitive single nucleotide primer extension (Ms-SNuPE)" NUCLEIC ACIDS RESEARCH, GB, OXFORD UNIVERSITY PRESS, SURREY, Bd. 25, Nr. 12, 1997, Seiten 2529-2531-2531, XP002106409 ISSN: 0305-1048 das ganze Dokument	

-/--


C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	<p>ZESCHNIGH M ET AL: "Imprinted segments in the human genome: different DNA methylation patterns in the Prader-Willi/Angelman syndrome region as determined by the genomic sequencing method"</p> <p>HUMAN MOLECULAR GENETICS,GB,OXFORD UNIVERSITY PRESS, SURREY, Bd. 6, Nr. 3, 1997, Seiten 387-395-395, XP002106412 ISSN: 0964-6906 das ganze Dokument</p> <p>---</p>	
A	<p>WO 97 45560 A (NORTH SHORE UNIVERSITY HOSPITA) 4. Dezember 1997 (1997-12-04) das ganze Dokument</p> <p>---</p>	
P,Y	<p>WO 99 28498 A (OLEK ALEXANDER ;WALTER JOERN (DE); EPIGENOMICS GMBH (DE); OLEK SVE) 10. Juni 1999 (1999-06-10) das ganze Dokument</p> <p>-----</p>	1-29

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die  ben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

P  E 99/03747

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument		Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie		Datum der Veröffentlichung
WO 9733000	A	12-09-1997	AU	2069597 A	22-09-1997
			CA	2248084 A	12-09-1997
			EP	0886681 A	30-12-1998
WO 9746705	A	11-12-1997	US	5786146 A	28-07-1998
			US	6017704 A	25-01-2000
			EP	0954608 A	10-11-1999
WO 9302216	A	04-02-1993	AT	151114 T	15-04-1997
			AU	664381 B	16-11-1995
			AU	2415992 A	23-02-1993
			CA	2113716 A	04-02-1993
			DE	69218776 D	07-05-1997
			DE	69218776 T	27-11-1997
			EP	0596028 A	11-05-1994
			IL	102550 A	18-03-1997
			JP	7500493 T	19-01-1995
			NZ	243615 A	25-06-1993
			ZA	9205427 A	28-04-1993
WO 9322457	A	11-11-1993	US	5750335 A	12-05-1998
WO 9745560	A	04-12-1997	US	5871917 A	16-02-1999
			AU	3228597 A	05-01-1998
WO 9928498	A	10-06-1999	DE	19754482 A	01-07-1999
			AU	2408599 A	16-06-1999

PCT

WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM
Internationales Büro



INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

(51) Internationale Patentklassifikation ⁷ : C12Q 1/68	A2	(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 00/31294 (43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 2. Juni 2000 (02.06.00)
(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/DE99/03747 (22) Internationales Anmeldedatum: 19. November 1999 (19.11.99) (30) Prioritätsdaten: 198 53 398.5 19. November 1998 (19.11.98) DE (71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): EPIGENOMICS GMBH [DE/DE]; Kastanienallee 24, D-10435 Berlin (DE). (72) Erfinder; und (75) Erfinder/Anmelder (nur für US): BERLIN, Kathrin [DE/DE]; Marienkäferweg 4, D-14532 Stahnsdorf (DE). (74) Anwalt: SCHUBERT, Klemens; Joachimstrasse 9, D-10119 Berlin-Mitte (DE).		(81) Bestimmungsstaaten: AE, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW, ARIPO Patent (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG). Veröffentlicht <i>Ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu veröffentlichen nach Erhalt des Berichts.</i>
(54) Title: METHOD FOR IDENTIFYING CYTOSINE METHYLATION PATTERNS IN GENOMIC DNA (54) Bezeichnung: VERFAHREN ZUR IDENTIFIKATION VON CYTOSIN-METHYLIERUNGSMUSTERN IN GENOMISCHER DNA (57) Abstract The invention relates to a method for identifying 5-methylcytosine positions in genomic DNA. The method is characterised by the following steps: a) the genomic DNA of a cell, a cell line, a tissue or an individual is chemically treated in such a way that the cytosine and 5-methylcytosine react differently and the two products present different base pairing behaviour in the duplex; b) the same nucleic acid section is amplified by means of a polymerase reaction; c) the same nucleic acid section of at least one other cell, cell line, tissue or individual or of any given reference DNA is treated according to steps a) and b); d) heteroduplexes are formed from the at least two amplification products obtained in steps b) and c); and e) a detectable marking is introduced into the heteroduplexes by means of a reaction that is specific to non-complementary base pairs. (57) Zusammenfassung Beschrieben ist ein Verfahren zur Identifikation von 5-Methylcytosin-Positionen in genomischer DNA, welches dadurch gekennzeichnet ist, daß folgende Verfahrensschritte ausgeführt werden: a) die genomische DNA einer Zelle, einer Zelllinie, eines Gewebes oder eines Individuums wird chemisch so behandelt, daß Cytosin und 5-Methylcytosin unterschiedlich reagieren und sich in der Duplex ein unterschiedliches Basenpaarungsverhalten der beiden Produkte ergibt, b) derselbe Nukleinsäure-Abschnitt mittels einer Polymerasereaktion amplifiziert wird, c) der gleiche Nukleinsäure-Abschnitt mindestens einer weiteren Zelle, Zelllinie, Gewebes oder Individuums oder einer beliebigen Referenz-DNA entsprechend den Punkten a) und b) behandelt wird, d) aus den mindestens zwei Amplifikaten der Punkte b) und c) Heteroduplexes gebildet werden, e) durch eine Reaktion, die spezifisch ist für nicht komplementäre Basenpaare, eine aufzeigbare Markierung in die Heteroduplex eingeführt wird.		

LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AL	Albanien	ES	Spanien	LS	Lesotho	SI	Slowenien
AM	Armenien	FI	Finnland	LT	Litauen	SK	Slowakei
AT	Österreich	FR	Frankreich	LU	Luxemburg	SN	Senegal
AU	Australien	GA	Gabun	LV	Lettland	SZ	Swasiland
AZ	Aserbaidshjan	GB	Vereinigtes Königreich	MC	Monaco	TD	Tschad
BA	Bosnien-Herzegowina	GE	Georgien	MD	Republik Moldau	TG	Togo
BB	Barbados	GH	Ghana	MG	Madagaskar	TJ	Tadschikistan
BE	Belgien	GN	Guinea	MK	Die ehemalige jugoslawische Republik Mazedonien	TM	Turkmenistan
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland	ML	Mali	TR	Türkei
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	MN	Mongolei	TT	Trinidad und Tobago
BJ	Benin	IE	Irland	MR	Mauretanien	UA	Ukraine
BR	Brasilien	IL	Israel	MW	Malawi	UG	Uganda
BY	Belarus	IS	Island	MX	Mexiko	US	Vereinigte Staaten von Amerika
CA	Kanada	IT	Italien	NE	Niger	UZ	Usbekistan
CF	Zentralafrikanische Republik	JP	Japan	NL	Niederlande	VN	Vietnam
CG	Kongo	KE	Kenia	NO	Norwegen	YU	Jugoslawien
CH	Schweiz	KG	Kirgisistan	NZ	Neuseeland	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	PL	Polen		
CM	Kamerun	KR	Republik Korea	PT	Portugal		
CN	China	KZ	Kasachstan	RO	Rumänien		
CU	Kuba	LC	St. Lucia	RU	Russische Föderation		
CZ	Tschechische Republik	LI	Liechtenstein	SD	Sudan		
DE	Deutschland	LK	Sri Lanka	SE	Schweden		
DK	Dänemark	LR	Liberia	SG	Singapur		
EE	Estland						

Verfahren zur Identifikation von Cytosin-Methylierungsmustern in genomischer DNA

5 Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Identifikation von 5-Methylcytosin-Positionen in genomischer DNA.

Die genetische Information, die durch vollständige Sequenzierung genomischer DNA als Basenabfolge erhalten
10 wird, beschreibt das Genom einer Zelle nur unvollständig. 5-Methylcytosin-Nucleobasen, die durch reversible Methylierung von DNA in der Zelle entstehen, sind ein epigenetischer Informationsträger und dienen beispielsweise zur Regulation von Promotoren. Der Methylierungszustand eines
15 Genoms repräsentiert den gegenwärtigen Status der Genexpression, ähnlich wie ein mRNA Expressionsmuster.

5-Methylcytosin ist die häufigste kovalent modifizierte Base in der DNA eukaryotischer Zellen. Sie spielt beispielsweise eine Rolle in der Regulation der Transkription, genomischem Imprinting und in der Tumorgenese. Die
20 Identifizierung von 5-Methylcytosin als Bestandteil genetischer Information ist daher von erheblichem Interesse. 5-Methylcytosin-Positionen können jedoch nicht durch Sequenzierung identifiziert werden, da 5-Methylcytosin das gleiche Basenpaarungsverhalten aufweist wie Cytosin. Unglücklicherweise geht bei einer PCR-Amplifikation die
25 epigenetische Information, die die 5-Methylcytosine tragen, vollständig verloren, und es existiert kein Verfahren diese Information durch einen Amplifikationsschritt
30 zu erhalten.

Es sind mehrere Verfahren bekannt, die diese Probleme lösen. Meist wird eine chemische Reaktion oder enzymatische

Behandlung der genomischen DNA durchgeführt, infolge derer sich die Cytosin- von den Methylcytosin-Nucleobasen unterscheiden lassen. Eine gängige Methode ist die Umsetzung von genomischer DNA mit Disulfit (auch als Bisulfit oder Pyrosulfit bezeichnet), die nach alkalischer Hydrolyse in zwei Schritten zu einer Umwandlung der Cytosin Basen in Uracil führt (Shapiro, R., Cohen, B., Servis, R. Nature 227, 1047 (1970). 5-Methylcytosin bleibt unter diesen Bedingungen unverändert. Die Umwandlung von C in U führt zu einer Veränderung der Basensequenz, aus der sich durch Sequenzierung nun die ursprünglichen 5-Methylcytosine ermitteln lassen (nur diese liefern noch eine Bande in der C-Spur).

Eine Übersicht über die weiteren bekannten Möglichkeiten, 5-Methylcytosine nachzuweisen, ist mitsamt der dazugehörigen Literatur dem folgenden Übersichtsartikel zu entnehmen: Rein, T., DePamphilis, M. L., Zorbas, H., Nucleic Acids Res. 26, 2255 (1998).

In der DD 293 139 A5 wird ein Verfahren zur Charakterisierung bestimmter DNA-Sequenzen beschrieben, bei dem die DNA-Moleküle, deren nichtmethylierte Erkennungsorte durch eine entsprechende Restriktionsendonuklease geschnitten werden sollen, im Reaktionsgemisch mit einer zweiten, unmethylierten DNA-Species (vor allem Oligonukleotid-Duplexe, die den Erkennungsort enthalten) inkubiert.

Die WO 97/46705 A1 offenbart ein Verfahren zum Nachweis einer methylierten, CpG enthaltenden Nukleinsäure, wobei man die Nukleinsäure enthaltende Probe mit einem Reagenz in Kontakt bringt, welches unmethyliertes Cytosin modifiziert, die CpG enthaltende Nukleinsäure in der Probe mittels CpG-spezifischen Oligonukleotidprimern amplifiziert, wobei der Oligonukleotidprimer zwischen modifizierten me-

thylierten und nichtmethylierten Nukleinsäuren unterscheidet und die methylierten Nukleinsäuren nachweist.

5 Ferner beschreibt US 5,824,471 A1 ein Verfahren zur Bestimmung von Abweichungen zwischen zwei Nukleinsäuresträngen, wobei eine Vielzahl von Duplexen aus den beiden Strängen oder deren Teile gebildet und diese Duplex mit einer ersten und einer zweiten unterschiedlichen Bakteriophagen Resolvase in Kontakt gebracht wird und wobei
10 man dann feststellt, von welcher Bakteriophagen Resolvase die Duplex gespalten wird, wobei hierdurch die Unterschiede ermittelt werden.

15 Nicht immer jedoch ist es erforderlich, tatsächlich die gesamte Sequenz eines Gens oder Genabschnitts zu ermitteln, wie dies bei einer Sequenzierung das Ziel ist. Dies ist insbesondere dann der Fall, wenn wenige 5-Methylcytosin-Positionen innerhalb einer längeren Basensequenz für eine Vielzahl von unterschiedlichen Proben abzutasten
20 sind. Die Sequenzierung liefert hier in großem Umfang redundante Information und ist zudem sehr teuer. Dies ist auch schon dann der Fall, wenn die Sequenz bereits bekannt ist und ausschließlich Methylierungspositionen dargestellt werden sollen. Auch ist es denkbar, daß in einigen Fällen überhaupt nur die Unterschiede im Methylierungsmuster zwischen verschiedenen genomischen DNA-Proben
25 von Interesse sind und daß auf die Ermittlung einer Vielzahl übereinstimmender methylierter Positionen wie auch auf die Sequenzierung verzichtet werden kann. Für die
30 hier angeführten Fragestellungen existiert bislang kein Verfahren, das ohne Sequenzierung jeder einzelnen Probe kostengünstig die gewünschten Ergebnisse liefert.

35 Sequenzinformation muß auch deshalb immer weniger neu ermittelt werden, weil die Genomprojekte, deren Ziel die

vollständige Sequenz verschiedener Organismen ist, zügig voranschreiten. Vom menschlichen Genom sind zwar derzeit erst etwa 5 % fertig sequenziert, jedoch kommen jetzt, weil andere Genomprojekte dem Ende zuneigen und dadurch
5 Sequenzierressourcen frei werden, jedes Jahr weitere 5 % dazu. Mit der Vervollständigung der Sequenzierung des menschlichen Genoms wird bis zum Jahre 2006 gerechnet.

Matrix-assistierte Laser Desorptions/Ionisations Massenspektrometrie (MALDI) ist eine neue, sehr leistungsfähige
10 Entwicklung für die Analyse von Biomolekülen (Karas, M. and Hillenkamp, F. 1988. Laser desorption ionization of proteins with molecular masses exceeding 10.000 daltons. Anal. Chem. 60: 2299-2301). Ein Analytmolekül wird in ei-
15 ne im UV absorbierende Matrix eingebettet. Durch einen kurzen Laserpuls wird die Matrix ins Vakuum verdampft und der Analyt so unfragmentiert in die Gasphase befördert. Eine angelegte Spannung beschleunigt die Ionen in ein feldfreies Flugrohr. Auf Grund ihrer verschiedenen Massen
20 werden Ionen unterschiedlich stark beschleunigt. Kleinere Ionen erreichen den Detektor früher als größere. Die Flugzeit wird in die Masse der Ionen umgerechnet. Derzeit ist diese Technologie in der Lage im Massenbereich von 1.000 bis 4.000 Da Moleküle mit einer Massendifferenz von
25 1 Da zu unterscheiden. Durch die natürliche Verteilung von Isotopen sind die meisten Biomoleküle jedoch schon etwa 5 Da breit. Technisch ist diese massenspektrometrische Methode also vorzüglich für die Analyse von Biomolekülen geeignet. Vernünftigerweise müssen zu analysierende
30 Produkte, die unterschieden werden sollen, mindestens 5 Da auseinander liegen. In diesem Massenbereich könnten also 600 Moleküle unterschieden werden. Im Bereich zwischen 4.000 und 100.000 Da wird zwar nicht mehr Isotopenauflösung erzielt, jedoch ist dieser Bereich auch anwend-

bar. Kürzlich ist der Einsatz eines infrarot (IR) Lasers gekoppelt mit der MALDI Analyse von DNA beschrieben worden (Berkenkamp, S., Kirpkar, F. and Hillenkamp, F. 1998. Infrared MALDI mass spectrometry of large nucleic acids. Science. 281: 260-262). Durch diese Kombination wurde es möglich DNA Fragmente mit einer Größe von bis zu 2.500 Basen zu detektieren.

Chemical mismatch cleavage ist eine Methode mit welcher kleine Unterschiede zwischen zwei DNA Einzelsträngen aufgezeigt werden können (Cotton, R.G.H., Rodriguez, N.R. and Campbell, R.D. 1988. Reactivity of cytosine and thymine in single-base-pair mismatches with hydroxylamine and osmium tetroxide and its application to the study of mutations. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 85: 4397-4401; Cotton, R.G.H. 1993. Current methods for mutation detection. Mut. Res. 285: 125-144; Saleeba, J.A. and Cotton, R.G.H. 1993. Chemical cleavage of mismatch to detect mutations. Methods in Enzymology. 217: 286-295; Smooker, P.M. and Cotton, R.G.H. 1993. The use of chemical reagents in the detection of DNA mutations. Mutations Res. 288: 65-77). Die chemische Reaktivität von C und T gegenüber Osmiumtetroxid und von C gegenüber Hydroxylamin ist erhöht, wenn diese nicht mit ihren jeweiligen komplementären Basen gepaart sind. Durch die anschließende Behandlung mit Piperidin wird der Nukleinsäurestrang an der modifizierten Position gebrochen.

Eine weitere Möglichkeit nicht komplementäre Basenpaare in Heteroduplex DNA aufzuzeigen, besteht im Einsatz von Enzymen wie MutS, die an nicht komplementäre Basenpaare binden (Smith, J. und Modrich, P. 1996. Mutation detection with MuthH, MutL and MutS mismatch repair proteins. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93: 4374-4379; Parsons, B.L.

und Heflich, R.H. 1997. Evaluation of MutS as a tool for direct measurement of point mutations in genomic DNA. Mut. Res. 374: 277-285).

- 5 Derzeit fehlt ein schnelles, kostengünstiges und automatisierbares Verfahren zur Auffindung von methylierten Cytosinen in genomischer DNA. Ein solches Verfahren ist aber von großem Interesse, da unterschiedliche Methylierungsmuster auf vielfältige Weise zur Charakterisierung
- 10 von Zelltypen und damit zur Diagnose und Klassifizierung von Krankheiten (wie beispielsweise Tumoren) herangezogen werden können als auch zum Beispiel für Studien der Zelldifferenzierung genutzt werden könnten.
- 15 Aufgabe der vorliegenden Erfindung ist daher ein Verfahren zur kostengünstigen und parallelisierbaren Auffindung von epigenetischen Informationsträgern in Form von 5-Methylcytosin-Basen in genomischer DNA zu schaffen.
- 20 Die Aufgabe wird erfindungsgemäß durch ein Verfahren zur Identifikation von 5-Methylcytosin-Positionen in genomischer DNA gelöst, wobei man folgende Verfahrensschritte ausführt:
- 25 a) man behandelt die genomische DNA einer Zelle, einer Zelllinie, eines Gewebes oder eines Individuums chemisch derart, daß Cytosin und 5-Methylcytosin unterschiedlich reagieren und sich in der Duplex ein unterschiedliches Basenpaarungsverhalten der beiden Produkte ergibt,
- 30 b) man amplifiziert denselben Nukleinsäure Abschnitt mittels einer Polymerasereaktion,
- 35 c) man behandelt den gleichen Nukleinsäure Abschnitt mindestens einer weiteren Zelle, Zelllinie, Gewebes oder Individuums oder einer beliebigen Referenz-DNA entsprechend den Schritten a) und b),
- d) man bildet aus den mindestens zwei Amplifikaten der

Schritte b) und c) Heteroduplexes,

e) man führt durch eine Reaktion, die spezifisch ist für nicht komplementäre Basenpaare, eine aufzeigbare Markierung in die Heteroduplex ein.

5

Erfindungsgemäß bevorzugt ist es, daß man es zur Identifikation von Unterschieden im Cytosin-Methylierungsmuster zwischen verschiedenen Zellen, Zelllinien, Geweben und Individuen anwendet und nur Positionen aufzeigt, in denen die Cytosin-Methylierung zwischen unterschiedlichen Zellen, Zelllinien, Geweben oder Individuen variabel ist.

10

Weiterhin ist bevorzugt, daß man im Schritt a) gemäß ein Disulfit (Bisulfit, Pyrosulfit) als Reagenz zur selektiven Umwandlung von Cytosin in Uracil einsetzt, wobei 5-Methylcytosin unverändert bleibt.

15

Es ist ferner bevorzugt, daß man genomische DNA mehrerer Individuen, Gewebe, Zelllinien oder Zellen im Schritt b) gemeinsam amplifiziert.

20

Weiterhin ist bevorzugt, daß man genomische DNA mehrerer Individuen, Gewebe, Zelllinien oder Zellen separat amplifiziert und anschließend gemeinsam gemäß Schritt e) behandelt.

25

Erfindungsgemäß bevorzugt ist ferner, daß man durch Bildung von Heteroduplexes aus der DNA verschiedener Individuen, Gewebe, Zelllinien oder Zellen an den Positionen Basenfehlpaarungen erzeugt, an denen in der genomischen DNA ein 5-Methylcytosin lokalisiert war.

30

Bevorzugt ist auch, daß im Schritt d) durch Bildung von Heteroduplexes mit einer vollständig methylierten Referenz-DNA an den Positionen Basenfehlpaarungen auftreten, an denen sich in der genomischen DNA Cytosin befand.

35

Bevorzugt ist außerdem, daß im Schritt d) durch Bildung von Heteroduplexes mit einer vollständig demethylierten Referenz-DNA an den Positionen Basenfehlpaarungen auftreten, an denen sich in der genomischen DNA 5-Methylcytosin befand.

Erfindungsgemäß ist weiterhin bevorzugt, daß die Basenfehlpaarungen mittels "chemical mismatch cleavage" (chemische Veränderung an nicht komplementären Positionen) zu einer spezifischen oder hinreichend selektiven Rückratspaltung an diesen Positionen führen.

Außerdem ist bevorzugt, daß man die DNA an den Basenfehlpaarungen enzymatisch spezifisch oder hinreichend selektiv spaltet.

Beim erfindungsgemäßen Verfahren ist auch bevorzugt, daß man im Schritt e) 1 DNA-Fragmente erhält, deren Größe einen Rückschluß auf die Spaltungspositionen und damit auf die Position der Methylcytosine und/oder die zwischen verschiedenen Individuen, Gewebe, Zelllinien oder Zellen veränderlichen Methylierungspositionen erlaubt.

Bevorzugt ist, daß man die Analyse der Größe (Molekulargewichte) der DNA-Fragmente mittels Massenspektrometrie durchführt.

Besonders bevorzugt ist dabei, daß man die Fragmente mittels Matrix-assistierte Laser Desorptions/Ionisations Flugzeitmassenspektrometrie (MALDI) analysiert.

Besonders bevorzugt ist ferner, daß man die Fragmente mittels Electrospray Ionisations Massenspektrometrie (ESI) analysiert.

Insbesondere bevorzugt ist es, daß man die Größe der im Schritt e) erzeugten Fragmente der Leistungsfähigkeit des Massenspektrometers anpaßt.

5 Ganz besonders bevorzugt ist es, daß man mehrere PCRs eines Genabschnittes ausführt und die Primer schrittweise derart neu setzt, daß die zu erwartende Fragmentgröße jeweils mindestens in einer dieser PCRs in den mittels Massenspektrometrie nachweisbaren Massenbereich fällt.

10

Besonders bevorzugt ist es, daß man einen der PCR-Primer schrittweise um den maximal nachweisbaren Massenbereich des Massenspektrometers relativ zu dem anderen neu positioniert.

15

Erfindungsgemäß bevorzugt ist es, daß man im Schritt b) einen Primer der PCR mit einer chemischen Funktion versieht, so daß sich das PCR Produkt an einer Oberfläche immobilisieren läßt.

20

Erfindungsgemäß bevorzugt ist es auch, daß man das im Schritt b) hergestellte PCR Produkt in verschiedene Reaktionsgefäße überführt und die Oberflächen der Reaktionsgefäße chemisch so geartet sind, daß das PCR Produkt daran gebunden werden kann.

25

Besonders bevorzugt ist es auch, daß man im Schritt c) hergestellte PCR Produkte verschiedener Individuen in verschiedene, wie oben beschrieben zubereitete Reaktionsgefäße überführt.

30

Außerdem ist erfindungsgemäß bevorzugt, daß man für den Schritt e) ein Enzym einsetzt, welches mit einem nicht komplementären Basenpaar einen Komplex bildet.

35

Ganz besonders ist dabei bevorzugt, daß dieses Enzym MutS ist.

5 Weiterhin ist bevorzugt, daß das Enzym eine Markierung trägt, durch welche ein Komplex veranschaulicht werden kann.

10 Bevorzugt ist erfindungsgemäß auch, daß die Markierung eine Fluoreszenzmarkierung, eine Chemilumineszenzmarkierung, ein Massentag oder ein photochemisch abspaltbares Massentag ist.

15 Weiterhin ist erfindungsgemäß bevorzugt, daß man eine amplifizierte DNA-Probe gemäß Schritt c) in Anspruch 1, welche einen Unterschied zu einer amplifizierten DNA-Probe im Schritt b) in Anspruch 1 aufzeigt, in einem zweiten Durchlauf des Verfahrens selbst eine DNA-Probe nach Schritt b) in Anspruch 1 wird und mit allen anderen zu untersuchenden DNA-Proben vergleicht.

20 Auch ist erfindungsgemäß bevorzugt, daß man eine Vorselektion der massenspektrometrisch im Detail zu untersuchenden Genabschnitte über eine Fluoreszenzmarkierung oder Chemilumineszenzmarkierung des immobilisierten DNA-Stranges durchführt, deren Fehlen nach Durchführung der Schritte d) und e) des Anspruchs 1 und eines Waschschritts das Vorhandensein von methylierten Cytosinen im untersuchten genomischen DNA-Abschnitt anzeigt.

30 Ferner ist erfindungsgemäß bevorzugt, daß man eine Vorselektion der massenspektrometrisch im Detail zu untersuchenden Genabschnitte über eine unspezifischere Variante gemäß den Ansprüchen 20 bis 23 durchführt.

35 Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist ein Kit zur Durchführung des erfindungsgemäßen Verfah-

rens, umfassend DNA von mindestens zwei möglichst verschiedenen Individuen, Geweben, Zelllinien oder Zellen sowie Reagenzien um die variablen Methylierungspositionen aufzuzeigen.

5

Das erfindungsgemäße umfaßt ferner vollständig methylierte und/oder demethylierte DNA und Reagenzien, die zum Nachweis von methylierten Cytosinen in einer beliebigen DNA-Probe erforderlich sind.

10

Das erfindungsgemäße Verfahren dient zur Identifikation von 5-Methylcytosin-Positionen in genomischer DNA, die unterschiedlichsten Ursprungs sein kann. Die genomische DNA wird zunächst chemisch so behandelt, daß sich ein Unterschied in der Reaktion der Cytosin-Basen zu den 5-

15

Methylcytosin-Basen ergibt. Mögliche Reagenzien sind hier z. B. Disulfit (auch als Bisulfit oder Pyrosulfit bezeichnet), Hydrazin und Permanganat. In einer bevorzugten Variante des Verfahrens wird die genomische DNA mit Di-

20

sulfit in Gegenwart von Hydrochinon oder Hydrochinonderivaten behandelt, wobei selektiv nach anschließender alkalischer Hydrolyse die Cytosin-Basen in Uracil umgewandelt werden. 5-Methylcytosin bleibt unter diesen Bedingungen unverändert. Nach einem Aufreinigungsprozeß, der der Ab-

25

trennung des überschüssigen Disulfits dient, wird nun ein bestimmter Abschnitt der vorbehandelten genomischen DNA in einer Polymerasereaktion amplifiziert. In einer bevorzugten Variante des Verfahrens wird hier die Polymerasekettenreaktion eingesetzt. Anschließend wird derselbe Ab-

30

schnitt einer anderen genomischen DNA-Probe gleichermaßen amplifiziert. Die beiden Amplifikate werden zusammengegeben, wodurch sich partiell Heteroduplexes ausbilden. In einer bevorzugten Variante des Verfahrens erfolgt dies derart, daß einer der PCR-Primer eine zur Immobilisierung

geeignete Funktion trägt und daß nur ein Strang aus dem Amplifikat der ersten Probe immobilisiert wird und anschließend eine Hybridisation mit dem Amplifikat der zweiten Probe erfolgt. In einer weiteren bevorzugten Variante wird eine Vielzahl unterschiedlicher Amplifikate desselben Nukleinsäure-Abschnittes auf diese Art und Weise gegen den immobilisierten Einzelstrang aus dem Amplifikat der ersten Probe hybridisiert, welches auf viele Wells einer Mikrotiterplatte verteilt wurde. In jedem Well kann nun ein Hybridisationsexperiment durchgeführt werden.

Nach der Hybridisation wird ein Verfahren durchgeführt, das an den Positionen, in denen eine Basenfehlpaarung in der Heteroduplex auftritt, eine nachweisbare Markierung hinterläßt. In einer bevorzugten Variante des Verfahrens wird dies durch Chemical Mismatch Cleavage durchgeführt, das an den Positionen, an denen eine Basenfehlpaarung auftritt, zu einem Rückgratbruch führt. Die dadurch erhaltenen Fragmente lassen sich durch ein beliebiges Verfahren, das die Größe von DNA-Fragmenten aufzeigen kann, analysieren. Ein solches Verfahren sollte idealerweise Rückschlüsse auf jede Position in dem amplifizierten Nukleinsäureabschnitt der Probe erlauben, an denen eine Basenfehlpaarung in der Heteroduplex auftrat. Basenfehlpaarungen in der Heteroduplex sind insbesondere dann vorhanden, wenn in der DNA aus einer Probe an dieser Position Cytosin vorhanden war, das in Uracil umgewandelt wurde, in der anderen jedoch 5-Methylcytosin, das bei der chemischen Vorbehandlung unverändert blieb. Das Verfahren kann sowohl für den Vergleich zweier oder mehrerer genomischer DNA Proben genutzt werden, in diesem Fall liefert die Analyse der Fragmente nur die Unterschiede im Methylierungsmuster zwischen den beiden Proben im jeweiligen

amplifizierten Nukleinsäure Abschnitt. Es ist aber auch möglich, eine vollständig enzymatisch am C methylierte oder demethylierte DNA als Referenz einzusetzen. In diesem Fall liefert die Analyse der Fragmente alle 5-Methylcytosin-Positionen im jeweiligen amplifizierten Nukleinsäure Abschnitt.

In einer besonders bevorzugten Variante des Verfahren wird Massenspektrometrie für die Fragmentanalyse eingesetzt. Die Fragmente können nach vorheriger Aufreinigung im MALDI-Massenspektrometer analysiert werden. Alternativ können die Lösungen mit Electrospray Ionisations Massenspektrometrie (ESI) analysiert werden. Je nach Leistungsfähigkeit der Methode und des eingesetzten Instrumentes kann es erforderlich sein, den betreffenden Nukleinsäureabschnitt in mehreren Teilschritten zu untersuchen, indem in mehreren PCRs ein Primer schrittweise neu positioniert wird und sich damit unterschiedliche Teilamplifikate ergeben ("Primer Walking").

In einer Variante des Verfahrens können die Basenfehlpaarungen - alternativ zur Analyse von Fragmenten nach einer Rückgratspaltung in der Heteroduplex - auch durch ein Enzym nachgewiesen werden, das mit einem nicht komplementären Basenpaar einen Komplex bildet. In einer bevorzugten Variante ist dieses Enzym MutS, das eine Markierung, z. B. eine Fluoreszenz-, Chemiluminiszenz- oder Massenmarkierung, trägt.

In einer weiteren Variante des Verfahrens wird das Vorhandensein von Basenfehlpaarung, das heißt in diesem Fall auch von relevanter Information in dem amplifizierten Nukleinsäure Abschnitt, durch eine Fluoreszenz- oder Chemiluminiszenzmarkierung nachgewiesen. In einer bevorzugten

Variante des Verfahrens wird ein immobilisierter DNA Strang aus dem Amplifikat der Probe 1 an dem nicht zur Immobilisierung dienenden Ende mit einer Fluoreszenzmarkierung versehen. Mit dem Amplifikat der Probe 2 werden Heteroduplexes gebildet, die einem Chemical Mismatch Cleavage unterworfen werden. Findet eine Rückgratspaltung am immobilisierten Strang statt, so verschwindet nach einem denaturierenden Waschschrift die Fluoreszenzmarkierung, wird der Strang nicht gespalten, so bleibt die Markierung erhalten. Nur die Amplifikate, die gespalten wurden, werden nachfolgend massenspektrometrisch näher untersucht.

Beispiele

15

Beispiel 1

Verfahren zur Auffindung aller methylierten Cytosin-Positionen

20 Die zu untersuchende genomische DNA stammend aus einer Zelllinie oder möglichst nur einer Zelle wird auf zwei Reaktionsgefäße aufgeteilt und die eine Hälfte enzymatisch entweder vollständig am Cytosin methyliert oder demethyliert. Das Enzym wird thermisch inaktiviert und anschließend werden beide Teile wieder zusammengegeben und mit Disulfit und nachfolgend Alkali behandelt. Nach einer Aufreinigung wird mittels PCR amplifiziert.

30 Das nun durchgeführte chemical mismatch cleavage, das für C Mismatches spezifisch ist, führt zu einer Spaltung an den Positionen einer jeweiligen Heteroduplex, an denen ein ursprünglich methyliertes C vorgelegen hat, falls einer vollständigen Demethylierung der einen Hälfte der genomischen Probe durchgeführt wurde. Umgekehrt erfolgt ei-

ne Spaltung an allen ursprünglich nicht methylierten Positionen, falls eine vollständige Methylierung der einen Hälfte der genomischen Probe zuvor durchgeführt wurde. Zur Sicherheit können auch sowohl Methylierung als auch
5 Demethylierung als Referenz durchgeführt werden, in diesem Fall müssen diese jedoch in zwei PCRs getrennt eingesetzt werden.

Variante 1: Das obige Verfahren wird so durchgeführt, das
10 in der PCR ein Primer eingesetzt wird, der so funktionalisiert ist, daß nach der PCR eine einfache und spezifische Immobilisierung ermöglicht wird. Die Immobilisierung erfolgt an beads oder an der Oberfläche einer Mikrotiterplatte. Dies erlaubt die einfache Abtrennung von Bestandteilen der Polymerase- und mismatch cleavage Reaktionen.
15 Nach der chemical mismatch cleavage Reaktion wird die Duplex thermisch denaturiert und die Lösung abpipettiert. Die DNA-Fragmente werden aus dieser Lösung auf ein reversed phase Material aufgebracht und gereinigt.

20 Im Massenspektrometer ergeben die Fragmente eine "Leiter" von Peaks, die auf die methylierten Positionen schließen läßt. Es fallen aufgrund der symmetrischen Methylierung an CpG Positionen theoretisch immer zwei Peaks je CpG an,
25 die jeweils vom sense und vom antisense-Strang stammen.

Variante 2: Die Reaktionen werden in Lösung durchgeführt und eine Aufreinigung nach den einzelnen Reaktionsschritten erfolgt, wenn notwendig, jeweils über ein reversed
30 phase Material.

Variante 3: Mehrere Individuen oder Zelltypen werden parallel untersucht. Eine Referenz-DNA wird vollständig demethyliert und anschließend mit Disulfit behandelt. Sie

- wird nach Aufreinigung mittels PCR amplifiziert. Dabei wird wiederum ein Primer verwendet, der eine zur Immobilisierung geeignete Funktion trägt. Die Lösung wird auf die Wells einer Mikrotiterplatte verteilt und immobilisiert. Dann erfolgt eine Hybridisierung gegen die PCR-Produkte aus ebenfalls mit Disulfit behandelten Proben, jeweils eine je Well (siehe auch ausführliches Beispiel mit 97 Individuen).
- 5
- 10 Variante 4: In dem Fall, daß das Massenspektrometer den Meßbereich nicht abdecken kann, der für die Analyse des gesamten PCR-Produktes auf Methylierungen erforderlich wäre, kann der Bereich von Interesse auch schrittweise abgetastet werden, indem mehrere PCRs durchgeführt werden
- 15 und jeweils einer der Primer um den jeweiligen Meßbereich des Massenspektrometers näher an den anderen herangesetzt wird. Damit wird beispielsweise immer nur der Bereich erfaßt, der zwischen dem zu verschiebenden Primer der jeweiligen und der nächsten PCR liegt. Das Verfahren ist
- 20 mit den anderen Varianten kombinierbar.

Beispiel 2

Verfahren zur Auffindung von Positionen mit variabler Cytosin-Methylierung

- 25 DNA verschiedener Individuen oder Zelllinien wird gepoolt und wie oben beschrieben eine Behandlung mit Disulfit durchgeführt. Nach alkalischer Hydrolyse der Bisulfit-Addukte und Aufreinigung der Produkt-DNA wird diese mittels PCR amplifiziert. Anschließend wird erneut aufgereinigt und das PCR-Produkt nach einigen Minuten Reannealing
- 30 bei 25°C mit OsO₄ an den Positionen mit einem C Mismatch gespalten (chemical mismatch cleavage). Ein Mismatch C gegen A tritt immer dann auf, wenn vor der Bisulfit-

Behandlung nur in einigen Individuen dort ein methylier-
tes Cytosin vorhanden war. Gleichsam werden bei diesem
Prozeß auch etwaige SNPs (single nucleotide polymor-
phisms) zur Spaltung der DNA führen. Diese müssen von den
5 aufzufindenden Methylierungspositionen unterschieden wer-
den, was durch das oben beschriebene Verfahren zur Auf-
findung aller methylierten Cytosine gewährleistet ist.

Die Produkt DNA wird nun massenspektrometrisch wie oben
10 beschrieben untersucht. Wenn das anfangs generierte PCR-
Produkt eine größere Länge aufweist als mit der zur Ver-
fügung stehenden Technologie seitens der Massenspektrome-
trie nachzuweisen ist, so ist es möglich, daß die durch
das chemical mismatch cleavage produzierten Fragmente
15 nicht nachweisbar sind. Um dies zu umgehen, können mehre-
re PCRs iterativ durchgeführt werden, das heißt das ein
Primer immer konstant gehalten wird, während der andere
Primer immer in mehreren Schritten jeweils um die Nach-
weisgrenze des Massenspektrometers näher an dem anderen
20 Primer positioniert wird (Primer walking).

Beispiel 3

Verfahren mit 97 Individuen

25 Ein genomischer Abschnitt eines Individuums
(Referenzindividuum) wird mit Disulfit behandelt und da-
mit die Cytosine nach anschließender alkalischer Hydroly-
se des Bisulfitadduktes in Uracile umgewandelt. Die Me-
thylcytosine bleiben bei dieser Reaktionsfolge unangeta-
30 stet. Das Produkt wird aufgereinigt und mittels PCR
amplifiziert. Einer der PCR-Primer ist am 5'Ende mit ei-
ner chemischen Modifikation versehen, die zur Immobili-
sierung dient. Das Produkt dieser PCR wird in die 96 Kam-
mern einer Mikrotiterplatte gegeben und die Bindung der

PCR Produkte mit der Oberfläche induziert. Da nur ein Primer mit der chemischen Modifikation für die Bindung versehen ist, bindet nur ein DNA Strang an die Oberfläche. Die Platte wird gewaschen um Reagenzien der Bindungschemie und die komplementären Stränge zu beseitigen. 5
Somit ist die Platte mit dem Referenz-DNA-Stück vorbereitet. Der gleiche genomische Abschnitt wird in jedem der 96 anderen Individuen analog mit Disulfit behandelt und anschließend amplifiziert. Für diese PCR werden je zwei 10
normale, unmodifizierte Primer der gleichen Sequenz wie für das Referenzindividuum verwendet. Die 96 PCR Produkte werden in die 96 Wells der vorbereiteten Platte gegeben. Durch Aufheizen und langsames Abkühlen werden die komplementären Stränge der 96 Individuen an die Referenz DNA 15
hybridisiert (Bildung der Heteroduplex). Die 96 Individuen und Reagenzien vorheriger Reaktionen zu beseitigen. Eine OsO_4 -Lösung wird in jedes der 96 Wells zugegeben, inkubiert und anschließend mit Piperidin ein Rückgratbruch in einer Heteroduplex mit einem nicht komplementären Basenpaar, von der eine Base C ist, induziert. Dies 20
ist immer dann der Fall, wenn nur in einem Strang der Heteroduplex, das heißt in einem der Individuen, ein Methylcytosin anstelle eines Cytosins vorgelegen hat. In diesem Fall wurde nur das Cytosin des einen Individuums 25
vor der PCR in ein Uracil überführt, wodurch sich in der Heteroduplex mit dem Gegenstrang eines anderen Individuums ein Mismatch ergibt. Der Assay ergibt also nicht direkt alle methylierten Cytosine eines genomischen Abschnittes, sondern nur diejenigen, die zwischen unterschiedlichen Individuen, Geweben, Zelllinien oder einzelnen 30
Zellen variabel sind.

Die Heteroduplex wird durch Aufheizen aufgeschmolzen und die Lösung in ein Massenspektrometer überführt.

Beispiel 4

Überführen der Lösung ins Massenspektrometer

- 5 Eine gute Variante ist die Lösung nach dem Schmelzen der Heteroduplex in eine Pipettenspitze aufzunehmen, die mit einem reversed-phase Material bestückt ist. Die DNA Produkte binden daran, indem sie hydrophobe Wechselwirkungen über ihre Trialkylammonium-Gegenionen ausbilden und können so in mehreren Waschschritten von Reagenzien der chemical mismatch cleavage gereinigt werden. Mit 30 % Acetonitril können die DNA Produkte wieder vom reverse-phase Material gelöst werden. Es bietet sich dabei an, die Produkte direkt auf eine vorbereitete Matrix auf einem MALDI Target zu geben. Nach dem Eintrocknen wird das Target ins Massenspektrometer eingeführt und die Produkte analysiert.

Beispiel 5

- 20 Vorselektion mittels Fluoreszenzmarkierung von für die Methylierungsdetektion relevanten Genabschnitten

- Die zu untersuchende genomische DNA wird nach der wie oben beschriebenen Bisulfit Reaktion mit nachfolgender PCR Amplifikation, bei der wiederum einer der Primer eine zur nachfolgenden Immobilisierung dienliche Funktion trägt, an Beads oder einer entsprechend beschichteten Mikrotiterplatte immobilisiert. Vollständig demethylierte DNA, wie die Proben-DNA behandelt, wird als Referenz DNA verwendet und bildet mit der immobilisierten Proben-DNA eine Heteroduplex. Dann wird enzymatisch, beispielsweise mit terminal transferase, an die 3'-Enden des Produktes eine einzelne fluoreszenzmarkierte Base angehängt. Die nachfolgend durchgeführte "Chemical Mismatch Cleavage"

Reaktion führt in dem Fall, das sich ein C/A Mismatch in dem Produkt befindet, zu einer Spaltung des immobilisierten Stranges, so daß nach der thermischen Dehybridisierung alle Fluoreszenzmarkierungen im nachfolgenden Waschschritt entfernt werden. War also eine Methylierung innerhalb des Amplifikates vorhanden, so tritt keine Fluoreszenz in der Mikrotiterplatte oder am bead mehr auf. Diese bleibt nur dann erhalten, wenn kein Mismatch vorliegt und damit keine 5-Methylcytosine im fraglichen Genabschnitt vorhanden sind. Bei dem Verfahren ist zu berücksichtigen, daß z. B. SNPs ein falsch positives Signal ergeben können.

Sinngemäß kann dieses Verfahren auch zur einfachen, fluoreszenzbasierten Detektion von 5-Methylcytosinen in kleinen Genabschnitten, z. B. Promotoren genutzt werden. Es kann aber nur die Aussage getroffen werden, ob in der fraglichen Region Methylierungen vorliegen oder nicht, nicht aber wieviele und an welchen Positionen. Dem steht allerdings ein relativ geringer experimenteller Aufwand und eine gute Parallelisierbarkeit entgegen.

Bei den als relevant klassifizierten Genabschnitten kann dann analog einem der oben angeführten Beispiele die genaue Position den Methylcytosine durch Massenspektrometrie ermittelt werden.

Beispiel 6

Vorselektion von Heteroduplexes mit Mismatches

30

Die in einer Mikrotiterplatte immobilisierten Heteroduplexes werden zunächst mit einer Lösung von MutS, an welches ein fluoreszenter Farbstoff gebunden ist, zusammengebracht. Nur die Gefäße, in denen sich MutS an Basen-

5 fehlpaarungspositionen angelagert hat, was sich dadurch zeigt, daß nach mehreren Waschschritten immer noch die Fluoreszenz detektierbar ist, werden nachfolgend dem chemical mismatch cleavage unterworfen und im Massenspektrometer analysiert. Dadurch wird Zeit im Massenspektrometer und die Kosten für die Aufreinigung gespart, indem die Analyse von Proben ohne nachweisbare epigenetische Information vermieden wird.

Patentansprüche

1. Verfahren zur Identifikation von 5-Methylcytosin-
Positionen in genomischer DNA dadurch gekennzeichnet,
daß man folgende Verfahrensschritte ausführt:
- a) man behandelt die genomische DNA einer Zelle,
einer Zelllinie, eines Gewebes oder eines Individuums
chemisch derart, daß Cytosin und 5-Methylcytosin un-
terschiedlich reagieren und sich in der Duplex ein
unterschiedliches Basenpaarungsverhalten der beiden
Produkte ergibt,
- b) man amplifiziert denselben Nukleinsäure Ab-
schnitt mittels einer Polymerasereaktion,
- c) man behandelt den gleichen Nukleinsäure Ab-
schnitt mindestens einer weiteren Zelle, Zelllinie,
Gewebes oder Individuums oder einer beliebigen Refer-
enz-DNA entsprechend den Schritten a) und b),
- d) man bildet aus den mindestens zwei Amplifikaten
der Schritte b) und c) Heteroduplexes,
- e) man führt durch eine Reaktion, die spezifisch
ist für nicht komplementäre Basenpaare, eine aufzeig-
bare Markierung in die Heteroduplex ein.
2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet,
daß man es zur Identifikation von Unterschieden im
Cytosin-Methylierungsmuster zwischen verschiedenen
Zellen, Zelllinien, Geweben und Individuen anwendet
und nur Positionen aufzeigt, in denen die Cytosin-
Methylierung zwischen unterschiedlichen Zellen, Zel-
linien, Geweben oder Individuen variabel ist.

3. Verfahren nach den Ansprüchen 1 bis 2, dadurch gekennzeichnet, daß man im Schritt a) gemäß Anspruch 1 ein Disulfit (Bisulfit, Pyrosulfit) als Reagenz zur
5 selektiven Umwandlung von Cytosin in Uracil einsetzt, wobei 5-Methylcytosin unverändert bleibt.
4. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, daß man genomische DNA mehrerer Individuen, Gewebe, Zelllinien oder Zellen im Schritt b)
10 des Anspruchs 1 gemeinsam amplifiziert.
5. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, daß man genomische DNA mehrerer Individuen, Gewebe, Zelllinien oder Zellen separat amplifiziert und anschließend gemeinsam gemäß Schritt e)
15 des Anspruchs 1 behandelt.
6. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 5, dadurch gekennzeichnet, daß man durch Bildung von Heteroduplexes aus der DNA verschiedener Individuen, Gewebe, Zelllinien oder Zellen an den Positionen Basenfehlpaarungen erzeugt, an denen in der genomischen DNA ein
20 5-Methylcytosin lokalisiert war.
7. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß im Schritt d) durch Bildung von Heteroduplexes mit einer vollständig methylierten Referenz-DNA an den Positionen Basenfehlpaarungen auftreten, an denen
25 sich in der genomischen DNA Cytosin befand.
8. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß im Schritt d) durch Bildung von Heteroduplexes mit einer vollständig demethylierten Referenz-DNA an den Positionen Basenfehlpaarungen auftreten, an denen
30 sich in der genomischen DNA 5-Methylcytosin befand.
- 35

- 5 9. Verfahren nach einem der Ansprüche 6 bis 8, dadurch gekennzeichnet, daß die Basenfehlpaarungen mittels "chemical mismatch cleavage" (chemische Veränderung an nicht komplementären Positionen) zu einer spezifischen oder hinreichend selektiven Rückgratspaltung an diesen Positionen führen.
- 10 10. Verfahren nach einem der Ansprüche 6 bis 8, dadurch gekennzeichnet, daß man die DNA an den Basenfehlpaarungen enzymatisch spezifisch oder hinreichend selektiv spaltet.
- 15 11. Verfahren nach einem der Ansprüche 1. bis 10, dadurch gekennzeichnet, daß man im Schritt e) gemäß Anspruch 1 DNA-Fragmente erhält, deren Größe einen Rückschluß auf die Spaltungspositionen und damit auf die Position der Methylcytosine und/oder die zwischen verschiedenen Individuen, Gewebe, Zelllinien oder Zellen veränderlichen Methylierungspositionen erlaubt.
- 20 12. Verfahren nach Anspruch 11, dadurch gekennzeichnet, daß man die Analyse der Größe (Molekulargewichte) der DNA-Fragmente mittels Massenspektrometrie durchführt.
- 25 13. Verfahren nach Anspruch 12, dadurch gekennzeichnet, daß man die Fragmente mittels Matrix-assistierte Laser Desorptions/Ionisations Flugzeitmassenspektrometrie (MALDI) analysiert.
- 30 14. Verfahren nach Anspruch 12, dadurch gekennzeichnet, daß man die Fragmente mittels Electrospray Ionisations Massenspektrometrie (ESI) analysiert.
- 35 15. Verfahren nach den Ansprüchen 13 oder 14, dadurch gekennzeichnet, daß man die Größe der im Schritt e) ge-

maß Anspruch 1 erzeugten Fragmente der Leistungsfähigkeit des Massenspektrometers anpaßt.

- 5 16. Verfahren nach Anspruch 15, dadurch gekennzeichnet, daß man mehrere PCRs eines Genabschnittes ausführt und die Primer schrittweise derart neu setzt, daß die zu erwartende Fragmentgröße jeweils mindestens in einer dieser PCRs in den mittels Massenspektrometrie nachweisbaren Massenbereich fällt.
- 10 17. Verfahren nach Anspruch 16, dadurch gekennzeichnet, daß man einen der PCR-Primer schrittweise um den maximal nachweisbaren Massenbereich des Massenspektrometers relativ zu dem anderen neu positioniert.
- 15 18. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß man im Schritt b) einen Primer der PCR mit einer chemischen Funktion versieht, so daß sich das PCR Produkt an einer Oberfläche immobilisieren läßt.
- 20 19. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß man das im Schritt b) hergestellte PCR Produkt in verschiedene Reaktionsgefäße überführt und die Oberflächen der Reaktionsgefäße chemisch so geartet sind, daß das PCR Produkt daran gebunden werden kann.
- 25 20. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß man im Schritt c) hergestellte PCR Produkte verschiedener Individuen in verschiedene nach Anspruch 19 zubereitete Reaktionsgefäße überführt.
- 30 21. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß man für den Schritt e) ein Enzym
- 35

einsetzt, welches mit einem nicht komplementären Basenpaar einen Komplex bildet.

- 5 22. Verfahren nach Anspruch 21, dadurch gekennzeichnet, daß dieses Enzym MutS ist.
- 10 23. Verfahren nach Anspruch 21, dadurch gekennzeichnet, daß das Enzym eine Markierung trägt, durch welche ein Komplex veranschaulicht werden kann.
- 15 24. Verfahren nach Anspruch 21, dadurch gekennzeichnet, daß die Markierung eine Fluoreszenzmarkierung, eine Chemilumineszenzmarkierung, ein Massentag oder ein photochemisch abspaltbares Massentag ist.
- 20 25. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 24, dadurch gekennzeichnet, daß man eine amplifizierte DNA-Probe gemäß Schritt c) in Anspruch 1, welche einen Unterschied zu einer amplifizierten DNA-Probe im Schritt b) in Anspruch 1 aufzeigt, in einem zweiten Durchlauf des Verfahrens selbst eine DNA-Probe nach Schritt b) in Anspruch 1 wird und mit allen anderen zu untersuchenden DNA-Proben vergleicht.
- 25 26. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 25, dadurch gekennzeichnet, daß man eine Vorselektion der massenspektrometrisch im Detail zu untersuchenden Genabschnitte über eine Fluoreszenzmarkierung oder Chemilumineszenzmarkierung des immobilisierten DNA-
- 30 Stranges durchführt, deren Fehlen nach Durchführung der Schritte d) und e) des Anspruchs 1 und eines Waschschriffs das Vorhandensein von methylierten Cytosinen im untersuchten genomischen DNA-Abschnitt anzeigt.
- 35

27. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 25, dadurch gekennzeichnet, daß man eine Vorselektion der massenspektrometrisch im Detail zu untersuchenden Genabschnitte über eine unspezifischere Variante gemäß den Ansprüchen 20 bis 23 durchführt.
- 5
28. Kit zur Durchführung eines Verfahrens nach Anspruch 1, umfassend DNA von mindestens zwei möglichst verschiedenen Individuen, Geweben, Zelllinien oder Zellen sowie Reagenzien um die variablen Methylierungspositionen aufzuzeigen.
- 10
29. Kit zur Durchführung des Verfahrens nach Anspruch 1 umfassend vollständig methylierte und/oder demethylierte DNA und Reagenzien, die zum Nachweis von methylierten Cytosinen in einer beliebigen DNA-Probe erforderlich sind.
- 15

VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT IM GEBIET DES PATENTWESENS

PCT

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

(Artikel 18 sowie Regeln 43 und 44 PCT)

Aktenzeichen des Anmelders oder Anwalts E01/1084/W0	WEITERES VORGEHEN siehe Mitteilung über die Übermittlung des internationalen Recherchenberichts (Formblatt PCT/ISA/220) sowie, soweit zutreffend, nachstehender Punkt 5	
Internationales Aktenzeichen PCT/DE 99/ 03747	Internationales Anmeldedatum (Tag/Monat/Jahr) 19/11/1999	(Frühestes) Prioritätsdatum (Tag/Monat/Jahr) 19/11/1998
Anmelder EPIGENOMICS GMBH et al.		

Dieser internationale Recherchenbericht wurde von der internationalen Recherchenbehörde erstellt und wird dem Anmelder gemäß Artikel 18 übermittelt. Eine Kopie wird dem internationalen Büro übermittelt.

Dieser internationale Recherchenbericht umfaßt insgesamt 4 Blätter.

☒ Darüber hinaus liegt ihm jeweils eine Kopie der in diesem Bericht genannten Unterlagen zum Stand der Technik bei.

1. Grundlage des Berichts

- a. Hinsichtlich der **Sprache** ist die internationale Recherche auf der Grundlage der internationalen Anmeldung in der Sprache durchgeführt worden, in der sie eingereicht wurde, sofern unter diesem Punkt nichts anderes angegeben ist.
- ☐ Die internationale Recherche ist auf der Grundlage einer bei der Behörde eingereichten Übersetzung der internationalen Anmeldung (Regel 23.1 b)) durchgeführt worden.
- b. Hinsichtlich der in der internationalen Anmeldung offenbarten **Nucleotid- und/oder Aminosäuresequenz** ist die internationale Recherche auf der Grundlage des Sequenzprotokolls durchgeführt worden, das
- ☐ in der internationalen Anmeldung in schriftlicher Form enthalten ist.
- ☐ zusammen mit der internationalen Anmeldung in computerlesbarer Form eingereicht worden ist.
- ☐ bei der Behörde nachträglich in schriftlicher Form eingereicht worden ist.
- ☐ bei der Behörde nachträglich in computerlesbarer Form eingereicht worden ist.
- ☐ Die Erklärung, daß das nachträglich eingereichte schriftliche Sequenzprotokoll nicht über den Offenbarungsgehalt der internationalen Anmeldung im Anmeldezeitpunkt hinausgeht, wurde vorgelegt.
- ☐ Die Erklärung, daß die in computerlesbarer Form erfaßten Informationen dem schriftlichen Sequenzprotokoll entsprechen, wurde vorgelegt.

2. ☐ Bestimmte Ansprüche haben sich als nicht recherchierbar erwiesen (siehe Feld I).

3. ☐ Mangelnde Einheitlichkeit der Erfindung (siehe Feld II).

4. Hinsichtlich der Bezeichnung der Erfindung

- ☒ wird der vom Anmelder eingereichte Wortlaut genehmigt.
- ☐ wurde der Wortlaut von der Behörde wie folgt festgesetzt:

5. Hinsichtlich der Zusammenfassung

- ☒ wird der vom Anmelder eingereichte Wortlaut genehmigt.
- ☐ wurde der Wortlaut nach Regel 38.2b) in der in Feld III angegebenen Fassung von der Behörde festgesetzt. Der Anmelder kann der Behörde innerhalb eines Monats nach dem Datum der Absendung dieses internationalen Recherchenberichts eine Stellungnahme vorlegen.

6. Folgende Abbildung der Zeichnungen ist mit der Zusammenfassung zu veröffentlichen: Abb. Nr. _____

- ☐ wie vom Anmelder vorgeschlagen ☐ keine der Abb.
- ☐ weil der Anmelder selbst keine Abbildung vorgeschlagen hat.
- ☐ weil diese Abbildung die Erfindung besser kennzeichnet.

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie°	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der In Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	ZESCHNIGH M ET AL: "Imprinted segments in the human genome: different DNA methylation patterns in the Prader-Willi/Angelman syndrome region as determined by the genomic sequencing method" HUMAN MOLECULAR GENETICS,GB,OXFORD UNIVERSITY PRESS, SURREY, Bd. 6, Nr. 3, 1997, Seiten 387-395-395, XP002106412 ISSN: 0964-6906 das ganze Dokument	
A	WO 97 45560 A (NORTH SHORE UNIVERSITY HOSPITA) 4. Dezember 1997 (1997-12-04) das ganze Dokument	
P,Y	WO 99 28498 A (OLEK ALEXANDER ;WALTER JOERN (DE); EPIGENOMICS GMBH (DE); OLEK SVE) 10. Juni 1999 (1999-06-10) das ganze Dokument	1-29

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
Y	WARNECKE ET AL.: "DETECTION AND MEASUREMENT OF PCR BIAS IN QUANTITATIVE METHYLATION ANALYSIS OF BISULPHITE-TREATED DNA" NUCLEIC ACIDS RESEARCH, Bd. 25, Nr. 21, 1997, Seiten 4422-4426, XP002138268 das ganze Dokument	1-29
Y	XIONG Z AND LAIRD P W: "COBRA: a sensitive and quantitative DNA methylation assay" NUCLEIC ACIDS RESEARCH,GB,OXFORD UNIVERSITY PRESS, SURREY, Bd. 25, Nr. 12, 1997, Seiten 2532-2534-2534, XP002106407 ISSN: 0305-1048 das ganze Dokument	1-29
Y	PROSSER J: "DETECTING SINGLE-BASE MUTATIONS" TRENDS IN BIOTECHNOLOGY,GB,ELSEVIER PUBLICATIONS, CAMBRIDGE, Bd. 11, 1. Juni 1993 (1993-06-01), Seiten 238-246, XP000601507 ISSN: 0167-7799 das ganze Dokument	1-29
Y	PRIMROSE: "GENOMANALYSE" 1995 , SPEKTRUM XP002138269 Seite 174 -Seite 179	1-29
A	GONZALGO M L AND JONES P A: "Rapid quantification of methylation differences at specific sites using methylation-sensitive single nucleotide primer extension (Ms-SNuPE)" NUCLEIC ACIDS RESEARCH,GB,OXFORD UNIVERSITY PRESS, SURREY, Bd. 25, Nr. 12, 1997, Seiten 2529-2531-2531, XP002106409 ISSN: 0305-1048 das ganze Dokument	

-/--

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

DE 99/03747

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9733000	A	12-09-1997	AU 2069597 A CA 2248084 A EP 0886681 A	22-09-1997 12-09-1997 30-12-1998
WO 9746705	A	11-12-1997	US 5786146 A US 6017704 A EP 0954608 A	28-07-1998 25-01-2000 10-11-1999
WO 9302216	A	04-02-1993	AT 151114 T AU 664381 B AU 2415992 A CA 2113716 A DE 69218776 D DE 69218776 T EP 0596028 A IL 102550 A JP 7500493 T NZ 243615 A ZA 9205427 A	15-04-1997 16-11-1995 23-02-1993 04-02-1993 07-05-1997 27-11-1997 11-05-1994 18-03-1997 19-01-1995 25-06-1993 28-04-1993
WO 9322457	A	11-11-1993	US 5750335 A	12-05-1998
WO 9745560	A	04-12-1997	US 5871917 A AU 3228597 A	16-02-1999 05-01-1998
WO 9928498	A	10-06-1999	DE 19754482 A AU 2408599 A	01-07-1999 16-06-1999